

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT

ARSTITEADUSKOND
BIO- JA SIIRDEMEDITSIINI INSTITUUT
MOLEKULAARPATOLOOGIA ÕPPETOOL

**Funktsionaalsed ja epigeneetilised muutused monotsüütides krooniliste põletikuliste
haiguste korral**

Magistritöö
Biomeditsiini õppekava
30 EAP

Ekaterina Krassohhina

Juhendajad
PhD Kai Kisand
MSc Epp Kaleviste

TARTU 2019

Funktsionaalsed ja epigeneetilised muutused monotsüütides krooniliste põletikuliste haiguste korral

Käesolevas magistritöös uuriti monotsüütide iseärasusi krooniliste põletikuliste haiguste korral. Selleks stimuleeriti monotsüüte infektsiooni mimikeerivate ligandidega. Pärast stimuleerimist suurenes põletikuliste tsütokiinide produktsioon uuritavates rakkudes. Statistiliselt olulisi erinevusi psoriaasi patsientide ja kontrollisikute monotsüütide vahel ei tuvastatud, kuid SEL (*systemic lupus erythematosus*) patsientide ja kontrollisikute vahel andsid statistiliselt olulise erinevuse geenid *TNFA* ja *MMP8*. Kromatiini immuunosadestamisel H3K27ac spetsiifilise antikehaga ja sadestatud DNA järjestuste analüüsimisel leiti, et nii patsientide kui ka kontrollisikute seondumiskohad asuvad enamasti enhaanseri alades. Võrreldes SEL (*systemic lupus erythematosus*) patsiente ja terveid kontrole leiti 1673 erinevalt rikastatud regiooni, mis vastutavad erinevate immunoloogiliste protsesside eest ja omavad põletikulistes protsessides osalevate transkriptsioonifaktorite seondumismotiive.

Märksõnad: Treenitud loomulik immuunsus, monotsüüdid, epigeneetika

CERCS kood : B500, B520

Functional and epigenetic changes in monocytes in chronic inflammatory diseases

In this Master's thesis were studied peculiarities of monocytes in chronic inflammatory diseases. For that monocyte were stimulated with infections mimicking ligands. After the stimulation, the expression of pro-inflammatory cytokines in comparison to unstimulated cells. No statistically significant differences were found between psoriasis patients and control subjects monocytes, but *TNFA* and *MMP8* genes showed statistically significant differences between patients with systemic lupus erythematosus and controls. As expected, active chromatin mark H3K27ac was mostly found at enhancer areas in monocytes from all studied groups. No differentially enriched regions were found between monocytes isolated from psoriasis patients and healthy controls. However, 1673 differently enriched regions were found when the H3K27ac binding sites were compared between systemic lupus erythematosus patients and healthy controls. These regions were associated with various immunological processes and had binding motifs of transcription factors involved in inflammatory processes

Keywords: Trained innate immunity, monocytes, epigenetic

CERCS: B500, B520

SISUKORD

SISUKORD	3
KASUTATUD LÜHENDID	5
SISSEJUHATUS.....	7
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE.....	8
1.1 Kaasasündinud ja omandatud immuunsus	8
1.1.1 Loomuliku immuunsüsteemi rakud.....	9
1.2 Treenitud loomulik immuunsus	11
1.3 Epigeneetiline geeni ekspressiooni regulatsioon.....	13
1.3.1 Histonide modifikatsioonid	14
1.4 Autoimmuunsed ja autoinflammatoorsed haigused	16
1.4.1 Psoriaas	18
1.4.2 Süsteemne erütematoosne luupus.....	19
2. EKSPERIMENTAALOSA	21
2.1 Töö eesmärgid.....	21
2.2 Materjal ja metoodika	21
2.2.1 Valim.....	21
2.2.2 Perifeerse vere mononukleaarsete rakkude eraldamine verest	21
2.2.3 Monotsüütide ehk CD14 ⁺ rakkude eraldamine.....	22
2.2.4 Rakkude stimuleerimine TLR ligandidega.....	22
2.2.5 Proovide RNA eraldamine ja cDNA süntees	23
2.2.6 Ekspressioonianalüüs	23
2.2.7 Kromatiini immunopretsipitatsioon	25
2.2.8 ChIP-i proovide qPCR analüüs	26
2.2.10 Raamatukogu ettevalmistamine	27
2.2.11 Sekveneerimine	27
2.2.12 ChIP-seq andmeanalüüs	27
2.2.13 Statistiline analüüs.....	28
2.3 Tulemused.....	29
2.3.1 Ekspressioonianalüüsi tulemused patsientide ja kontrollisikute stimuleeritud monotsüütides	
29	
2.3.2 ChIP-i katse qPCR	30
2.3.3 ChIP-seq ning uuritavate seondumiskohtade kattuvus genoomil.....	32
2.3.5 Seondumiskohtade visualiseerimine referentsgenoomil	33

2.3.6 Erinevalt rikastatud regioonid	34
2.3.7 SEL patsientide positiivsete DE regioonide seondumismotiivid	35
Arutelu	37
KOKKUVÕTE	39
SUMMARY	40
Tänu sõnad	41
Kasutatud kirjanduse loetelu	42
Kasutatud veebiaadress	51
LISAD	52
Lisa 1. Psoriaasi ja SEL patsientide ning tervete isikute monotsüütide stimuleerimine LPS ja LPS+Pam3CSK4 24 tundi.	52
Lisa 2. Proovide fragmentide ja piikide arv pärast filtreerimist.	52
Lisa 3. Psoriaasi patsientide ja tervete kontrollide seondumiskohtade jaotvus genoomis.	54

KASUTATUD LÜHENDID

AD	autoimmuunhaigus (<i>autoimmune disease</i>)
AID	autoinflammatoorne haigus (<i>autoinflammatory disease</i>)
BCG	<i>Bacillus Calmette-Guérin</i> (<i>Bacillus Calmette–Guérin</i>)
CD14	diferentseerumise klaster 14 (<i>cluster of differentiation 14</i>)
ChIP-seq	kromatiini immunosadestamine ja sekveneerimine (<i>chromatin immunoprecipitation and sequencing</i>)
DC	dendriitrakk (<i>dendritic cell</i>)
DE	erinevalt rikastatud regioonid (<i>differentially enriched regions</i>)
DNMT	DNA metüültransferaas (<i>DNA methyltransferase</i>)
Enh	enhaanser (<i>enhancer</i>)
H3K4me3	kolmanda histooni 4. lüsiini trimetülsatsioon (<i>Histone H3 lysine 4 trimethylation</i>)
H3K4me1	kolmanda histooni 4. lüsiini monometülsatsioon (<i>Histone H3 lysine 4 monomethylation</i>)
H3K27ac	kolmanda histooni 27. lüsiini atsetülsatsioon (<i>Histone H3 lysine 27 acetylation</i>)
HAT	histooni atsetüültransferaasid (<i>histone acetyltransferases</i>)
HDAC	histooni deatsetülaasid (<i>histone deacetylases</i>)
IFN	interferoon (<i>interferon</i>)
IL	interleukiin (<i>interleukin</i>)
LPS	lipopolüsahhariid (<i>lipopolysaccharide</i>)
NK	negatiivne kontroll (<i>negative control</i>)
NK cell	loomulikud tapjarakud (<i>natural killer cell</i>)
oxLDL	oksüdeeritud madala tihedusega lipoproteiin (<i>oxidized low-density lipoprotein</i>)
PBMC	perifeerse vere mononukleaarne rakk (<i>peripheral blood mononuclear cell</i>)
PBS	fosfaatpuhverdatud füsioloogiline lahus (<i>phosphate buffered saline</i>)
qPCR	kvantitatiivne polümeraasi ahelreaktsioon (<i>quantitative polymerase chain reaction</i>)

RT-PCR	pöördtranskriptsiooni polümeraasi ahelreaktsioon (reverse transcription polymerase chain reaction)
SD	standardhälve (<i>standard deviation</i>)
SEL	süsteemne erütematoosne luupus (<i>systemic lupus erythematosus</i>)
Th	T-helper (<i>T helper</i>)
TLR	Tolli-laadsed retseptorid (<i>Toll-like receptor</i>)
TNF	tuumori nekroosi faktor (<i>tumour necrosis factor</i>)
TSSAFlnk	külgnev aktiivne transkriptsiooni alguskoht (<i>Flanking Active TSS</i>)

SISSEJUHATUS

Põletik on protsess, mis tekib vastusena kahjustustele või patogeensele stiimulile. Autoimmuunhaiguste (AD, *autoimmune disease*) puhul on tegemist autoimmuunse põletikuga. AD korral kaob immuuntolerantsus ning immuunrakud alustavad rünnakut enda keha rakkude vastu. Psoriaas ja süsteemne erütematoosne luupus (SEL, *systemic lupus erythematosus*) on levinud autoimmuunhaigused, mille patogeneesimehhanismid on siiani kindlaks määramata.

Inimese organismis vastutavad kaitse eest kaasasündinud ja omandatud immuunmehhanismid. Põhiline erinevus on immunoloogilise mälu olemasolu omandatud immuunsüsteemis. See seisukoht on tänapäeval muutumas. Hiirtel, kellel puudub omandatud immuunsus, võib kaasasündinud immuunsüsteem samuti tõsta resistentsust juba esinenud infektsiooni vastu. Seda nähtust nimetatakse „treenitud immuunsuseks“ („*trained immunity*“) või „treenitud loomulikuks immuunsuseks“ („*trained innate immunity*“). Treenitud immuunsus väljendub selles, et pärast primaarset infektsiooni on kaasasündinud immuunvastus sekundaarsele infektsioonile palju tugevam. Need muutused tagatakse epigeneetilise regulatsiooniga, kui kromatiini kättesaadavus muutub põletikuliste tsütokiine kodeerivate geenide enhaanseralades. Sünnipärase immuunrakkude nagu monotsüütide ja makrofaagide metaboolne ja epigeneetiline ümberprogrammeerimine on aluseks kaasasündinud mälule ehk treenitud immuunsusele.

Käesoleva magistritöö eesmärgiks on uurida, kas kroonilise põletikuga kulgevate haiguste korral on monotsüütides tekkinud „treenitud loomulikule immuunsusele“ viitavaid muutusi. Töö teostati bio- ja siirdemeditiini instituudis, molekulaarpatoloogia töörühmas.

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1 Kaasasündinud ja omandatud immuunsus

Inimese immuunsüsteemi võib jagada kaasasündinud ja omandatud immuunsuseks. Kaasasündinud ehk mittespetsiifiline immuunsus omab reageerimisel kiiret vastust, kuid mälu funktsioon puudub. Omandatud (adaptiivne või spetsiifiline) immuunsust iseloomustab aeglane reageerimisvõime ning mälu olemasolu. Kaasasündinud ja omandatud immuunsuste võrdlus on välja toodud tabelis 1.

Kaasasündinud immuunsüsteem on esimene kaitseliin infektsiooni või koekahjustuste puhul. Immuunrakud ja molekulid aktiveeritakse mikroobide või teiste erinevate ohusignaalidega kokku puutudes. Omandatud immuunsus on evolutsiooniliselt hilisem kaitseliin, mis on kõrge spetsiifilisusega. See on võimalik tänu T-lümfotsüütidele, mis küpsevad tüümuses, ning B-lümfotsüütidele, mis tekivad luuüdis, ning mille retseptorid on suure varieeruvusega.

Tabel 1. Kaasasündinud ja omandatud immuunsuse võrdlus.

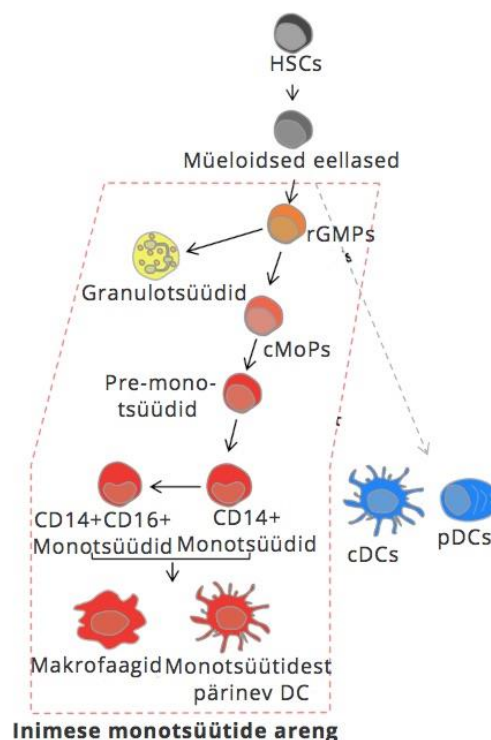
Omadused	Kaasasündinud immuunsus	Omandatud immuunsus
Spetsiifilisus	Madal: reageerib patogeenide klassidel konserveerunud molekulaarsete mustritega ja koekahjustusega seotud signaalidele	Kõrge: reageerib konkreetse molekulaarse struktuuriga
Dünaamika	Kiire (0-12 h)	Aeglane (1-2 nädalat)
Retseptorid	Kodeeritud iduliinis	Toimub retseptorite järjestuste somaatile ümberkorraldus
Mälu	Puudub	Immunoloogilise mälu tõttu on järjekordne vastus patogeenile kiirem ja tugevam kui esmane vastus
Mitmekesisus	Piiratud	Kõrge
Rakud	Makrofaagid, monotsüüdid, neutrofiilid, dendriitrakud, NK-rakud,	T- ja B-lümfotsüüdid

1.1.1 Loomuliku immuunsüsteemi rakud

Kaasasündinud immuunsüsteem koosneb nuumrakkudest, fagotsüütidest nagu makrofaagid, neutrofiilid, dendriitrakud ja monotsüüdid, ning samuti eosinofiilidest, basofiilidest ja NK rakkudest (Padovan ja Martin, 2016). Nuumrakud on koes elavad rakud, mis aitavad haavade paranemisele kaasa ning kaitsevad parasiitide eest, vabastades graanulites olevaid mediaatoreid nagu amiinid, proteoglükaanid ja proteaasid. Nuumrakkude aktiveerimine on sageli aluseks ebasoodsale immuunvastusele nagu allergiad, artriit ja anafülaktiline šokk (Spiering, 2015). Makrofaagid on rakud, mis otsivad ja fagotsütoosivad patogeene. Verest väljumisel ning kudedesse sisenemisel arenevad monotsüütidest makrofaagid. Nad aitavad eemaldada liigseid, kahjustatud või surnud rakke, mis on tähistatud kõrvaldamiseks pinnavalkudega (Spiering, 2015). Polümorfonukleaarsed leukotsüüdid ehk neutrofiilid on kõige arvukamad granulotsüüdid ning sissetungivate mikroorganismide vastu esmased kaitsjad (Kobayashi ja DeLeo, 2009). Neutrofiilid ringlevad tavaliselt veres ning vigastuse või nakkuse korral liiguvad nad kiiresti kahjustatud kohta (Spiering, 2015). Neutrofiilide töö puudused või arvukuse vähenemine on kahjulikud inimeste tervisele ning sageli põhjustavad tõsiseid ja korduvaid infektsioone (Kobayashi ja DeLeo, 2009). Dendriitrakud (DC, *dendritic cell*) mängivad olulist rolli peremehe immuunsuses, indutseerides kaasasündinud vastuseid patogeenidele, käivitades efektiivselt naiivseid T-rakke, aktiveerides mälu T-rakke ning soodustades B-rakkude aktiveerimist (Price ja Tarbell, 2015). Neutrofiilid, makrofaagid ja DC-d leiavad patogeene Tolli-laadsete retseptorite (TLR, *Toll-like receptors*) kaudu (Spiering, 2015). Eosinofiile leidub veres suhteliselt väikestes kogustes, 1-4% perifeerse vere leukotsüütidest (Shamri jt, 2011). Eosinofiilid arenevad luuüdis ning nende ülesandeks on suuremate parasiitide hävitamine ning allergiliste ja põletikuliste reaktsioonide moduleerimine (Spiering, 2015). Basofiilid pärinevad samuti luuüdist, ringlevad veres ja on kõige vähem arvukas valgevereliblede alatüüp (Spiering, 2015). Basofiilid vabastavad antikoagulante hepariini ja serotoniini, mis vähendavad vere hüübimist ja soodustavad vastavalt põletikule tüüpilist haava turset (Spiering, 2015). NK rakud on granulaarsed lümfotsüüdid, kes tunnevad ära viirusega nakatunud rakke ja kasvajakasvaja rakke ning hävitavad neid tänu tsütotoksilistele valkudele, mis vabanevad lüütilistest graanulitest (Topham ja Hewitt, 2009).

Monotsüüdid on multifunktsionaalsed, kuid põhilised funktsioonid on fagotsütoos, mille kaudu toimub mikroobide hävitamine, antigeeni esitus ning tsütokiinide tootmine. Olulist rolli mängivad TLR-d, mis tunnevad patogeenide pinnastruktuure ning edastavad

signaale erinevate põletikuliste tsütokiinide produtseerimiseks ja teiste fagotsüütide aktiveerimiseks (Kawasaki ja Kawai, 2014). Monotsüüdid ekspresseerivad mitmeid TLR-e, millest TLR-d 1, 2 ja 4 on kõige sagedasemad (Hornung jt, 2002). Bakteriaalne TLR2 ligand Pam3CSK4 aktiveerib NF- κ B signaaliraja kaudu põletikumediaatorite toodangut (Brandt jt, 2013). Bakteriaalset lipopolüsahhariidi (LPS, *lipopolysaccharide*) tuvastatakse imetajatel retseptorikompleksiga, mis koosneb CD14-st, TLR4-st ja MD2-st, ning mille poolt on põhjustatud TNF- α , IL-1 ja IL-6 tsütokiinide produktsioon (Latz jt, 2003; Blaque, 1998). Monotsüüdid toodavad selliseid pro-inflammatoorseid tsütokiine nagu interleukiin (IL)-1 α , IL-1 β , IL-6, tuumori nekroosi faktor (TNF, *tumour necrosis factor*)- α ning põletikuvastase toimega IL-1 retseptori antagonist (Willis jt, 2003). Monotsüüdid moodustuvad luuüdis ning pärast lahkumist tsirkuleerivad vereringes 1-3 päeva, liikudes seejärel kudedesse kogu kehas, kus diferentseeruvad makrofaagideks ja dendriitrakkudeks (joonis 1) (Germik jt, 2019). On näidatud, et põletiku ajal migreeruvad monotsüüdid verest kudedesse, kus muutuvad põletikulisteks makrofaagideks (Jakubzick jt, 2017).

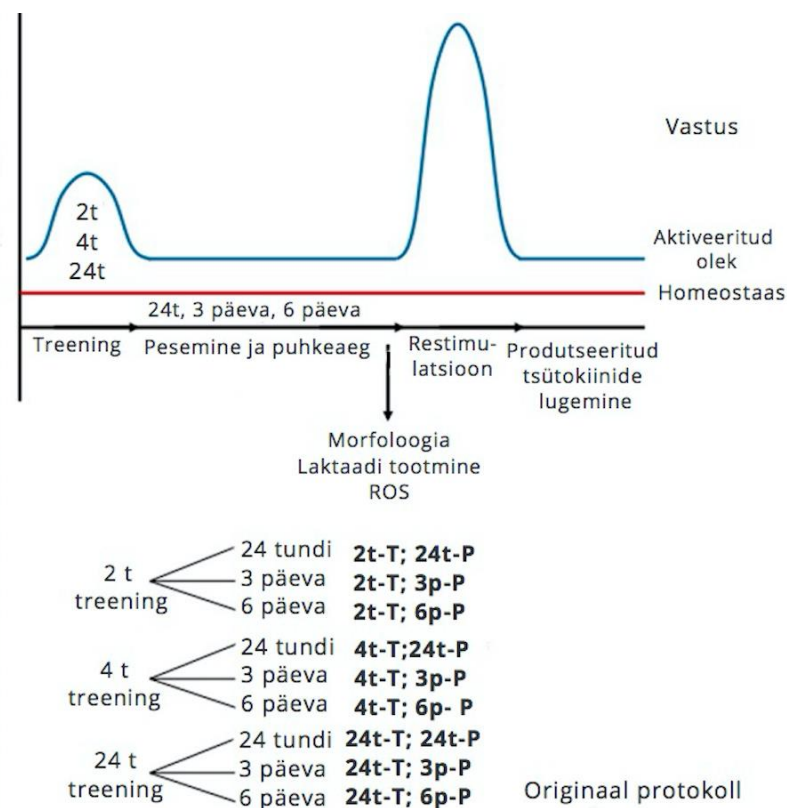


Joonis 1. Inimese monotsüütide diferentseerumise skeem. HSCs ehk hematopoeetilised tüvirakud arenevad luuüdis ning neist moodustuvad müeloidsed eellasrakud. Seejärel arenevad granulotsüütide-monotsüütide eellased (rGMPS, *conventional granulocyte-monocyte progenitors*), mis edasi jagunevad granulotsüütideks ja pre-monotsüütideks. Pre-monotsüütidest diferentseeruvad CD14⁺ rakud ning neist omakorda CD14⁺CD16⁺ monotsüüdid, millest arenevad makrofaagid ja monotsüütidest pärinevad dendriitrakud (Muudetud, Kawamura jt, 2017).

1.2 Treenitud loomulik immuunsus

Klassikaline immunoloogia õpetab, et ainult omandatud immuunsusel on immunoloogiline mälu, kuid see seisukoht on muutumas. Hiirtel, kellel puudub omandatud immuunsus, võib kaasasündinud immuunsüsteem samuti tõsta resistentsust juba esinenud infektsiooni vastu. Seda nähtust nimetatakse „treenitud immuunsuseks“ („*trained immunity*“) või „treenitud loomulikuks immuunsuseks“ („*trained innate immunity*“) (Netea jt, 2016). Treenitud immuunsus väljendub selles, et pärast primaarset infektsiooni on kaasasündinud immuunvastus sekundaarsele infektsioonile palju tugevam. Erinevalt adaptiivsest immuunmälest ei ole kaasasündinud immuunrakkude sekundaarne vastus suurenenud mitte spetsiifilise antigeeni suhtes, mis indutseeris primaarset vastust, vaid pigem on tõusnud mittespetsiifiline reaktsioon, mille tõttu on suurenenud vastupanuvõime ka teiste patogeenide suhtes (Netea jt, 2011). Tugevnenud immuunvastus on seotud intratsellulaarse metabolismi ja epigeneetilise reguleerimise muutusega histoonide modifikatsioonide tasemel (Saeed jt, 2014).

Treenitud immuunsust on demonstreeritud *in vitro* katsete abil. Bekkering koos oma kolleegidega viis läbi *in vitro* katseid, kus monotsüüte stimuleeriti kolme infektsiooni mimikeeriva stiimuliga: β -glükaan, *Bacillus Calmette-Guérin* (BCG, *Bacillus Calmette-Guérin*) vaktsiin ja oksüdeeritud madala tihedusega lipoproteiin (oxLDL, *oxidized low-density lipoprotein*). Esmane stimulatsioon kestis 2, 4 või 24 tundi, millele järgnes stimulandi eemaldamine ja puhkamise staadium, ning sekundaarsete bakteriaalsete stiimulitega stimuleerimine tehti mõne päeva pärast (joonis 2) (Bekkering jt, 2016). Stimuleeritud monotsüüdid näitasid suurenenud tsütokiini vastuseid sekundaarsete stimulatsioonide korral ning need mõjud olid kõige suuremad, kui treeningintervall oli 24 tundi ja puhkeaeg 6 päeva (Bekkering jt, 2016).



Joonis 2. Skemaatiline ülevaade treenitud immuunsuse metoodikast. Monotsüüte treeniti 2 tundi (2hr-T), 4 tundi (4hr-T) või 24 tundi (24h-T). Pärast treeningut pesti stiimulid maha ning rakkudele anti aega puhata 24 tundi (24h-R), 3 päeva (3d-R) või 6 päeva (6d-R), mille järel stimuleeriti uuesti RPMI, LPS või Pam3Cys-iga 24 tundi (Muudetud Bekkering jt, 2016).

β -glükaaniga treenitud makrofaagide transkriptoomi ja metabooloomi analüüs näitas mitmete peamiste metaboolsete radade ülesreguleerimist, nagu glükoosi ainevahetus, glutaminolüüs ja kolesterooli sünteesi rada (Arts jt, 2016, Cheng jt, 2014). Treenitud immuunsus on tingitud epigeneetilistest ümberkorraldustest histooni metüleerimise ja atsetüleerimise tasemel (Saeed jt, 2014). Pärast lühikest kokkupuudet β -glükaaniga, BCG-ga või oxLDL-ga treenitud makrofaagide fenotüüpi iseloomustab aktiivsele kromatiinile iseloomulike histooni modifikatsioonide, nagu H3K4me3 ja H3K4me1, rikastumine (Leentjens jt, 2018; Hoeksema ja Winther, 2016).

Treenitud loomulik immuunsus on suhteliselt uus uurimissuund ning siiani on uuritud põhiliselt positiivset mõju ehk vastupanuvõime tõusu haigusetekitajatele. Vähem aga on teada treenitud loomuliku immuunsuse negatiivsest küljest: potentsiaalselt võimendab see kroonilist põletikku.

1.3 Epigeneetiline geeni ekspressiooni regulatsioon

Epigeneetika kirjeldab mitootiliselt ja meiootiliselt päritud geeniekspressiooni muutusi, samas säilitades DNA nukleotiidses järjestuses (Wilson, 2008). Lisaks DNA järjestusele kontrollitakse transkriptsiooni regulatsiooni läbi mitme erineva mehhanismi – nukleosoomi positsioneerimine, DNA-d seondavad reguleerivad valgud nagu transkriptsioonifaktorid, mittekodeeriv RNA, DNA metülatsioon ning histoonide modifikatsioonid (Venters ja Pugh, 2009; Goodrich ja Kugel, 2006; Cvekl ja Duncan, 2007).

Nukleosoomi positsioneerimine on nukleosoomide asukoha määramine eukariootses DNA järjestuses. Nukleosoomi paiknemine on bioloogiliselt olulise funktsiooniga, näiteks nukleosoom inhibeerib teiste valkude seondumist DNA-ga (Struhl ja Segal, 2013). Geenide transkriptsioon sõltub informatsioonist DNA järjestusel, mida tõlgendavad transkriptsioonifaktorid (TF) või teised järjestuse spetsiifilised valgud (Ahsendorf jt, 2017). Nad seonduvad kindlatele kohtadele DNA järjestustel ning seeläbi kontrollivad mRNA molekulide transkriptsiooni DNA-lt (Latchman, 1997). Transkriptsioonifaktorid töötavad üksinda või koostöös teiste valkudega, soodustades või blokeerides RNA polümeraasi värbamist spetsiifilistele geenidele (Roeder, 1996; Nikolov ja Burley, 1997). Mittekodeerivad RNA-d (*non-coding RNA*, ncRNA) on RNA-de klass, mis ei kodeeri funktsionaalseid valke (Wei jt, 2017). Mitmed uuringud on näidanud, et miRNA-d, piRNA-d, endogeensed siRNA-d ja pikad mittekodeerivad RNA-d on reguleerivad RNA-d, ning mängivad olulist rolli epigeneetilises kontrollis (Wei jt, 2017). DNA metüleerimine ja histoonide modifikatsioonid on enim uuritud klassikalised epigeneetilise regulatsiooni mehhanismid, mis määravad raku transkriptsiooni aktiivsust tuumas (Zhang ja Wang, 2015). DNA metülatsioon on imetajate genoomis oluline epigeneetiline mehhanism, mis hõlmab metüülrühma liitmist tsütosiinile, moodustades 5-metüültsütosiini (Moore jt, 2013). See protsess reguleerib geeniekspressiooni, värvates geenide pärssimisega seotud valke või inhibeerides transkriptsioonifaktorite seondumist DNA-ga (Moore jt, 2013). Kõik need protsessid on olulised täiskasvanud organismi erinevate rakuliinide normaalseks arenguks ning diferentseerumiseks (Handy jt, 2011). Antud uurimistöös keskenduti histoonide modifikatsioonide uurimisele, kuna varasemad uuringud on näidanud, et histoonide modifikatsioonide (kirjeldatud punktis 1.3.1) mustri muutus on seotud treenitud loomuliku immuunsusega (Ostuni jt, 2013, Bekkering jt, 2013, Saeed jt, 2014, Leentjens jt, 2018).

1.3.1 Histoonte modifikatsioonid

DNA on üle ühe meetri pikk ning selle mahutamiseks tuuma pakitakse DNA eukariöotses rakus kokku (Mariño-Ramírez jt, 2005). Histoonte on 102-135 aminohappes koosnevad valgud, mis vastutavad DNA kokkupakkimise eest ning seetõttu on neil oluline roll geenide regulatsioonis (Henikoff ja Smith, 2015). On tuvastatud viis histoonte tüüpi: H1 (või H5), H2A, H2B, H3 ja H4. Nukleosoomsed histoonte H2A, H2B, H3 ja H4 esinevad kahes korduses, moodustades oktameeri. Nukleosoom koosneb histoonte oktameerist ning selle ümber keerdunud DNA-st (McGinty ja Tan, 2014). Linkerhistoon on H1 ja sellele homologne valk H5, mis seonduvad nukleosoomide vaheliste aladega (Henneman, 2018). Histoonte modifikatsioonid on histoontivalkude ensümaatilised posttranslatsioonilised modifikatsioonid, mis hõlmavad fosforüleerimist, ubikvitineerimist, atsetüleerimist, metüleerimist jt (Alhamwe jt, 2018). Need modifikatsioonid toimuvad peamiselt histoonte valkude aminotermiinalsetes sabades, mis läbi kromatiini struktuuri muutmise reguleerivad geeniekspressiooni (tabel 2) (Zhang ja Wang, 2015).

Tabel 2. Enimuuritud histoonte modifikatsioonid

Modifikatsioon	Funktsioon	Modifikatsiooni koht
Fosforüleerimine	Aktivatsioon	H3S10p (Johansen ja Johansen, 2006)
Ubikvitineerimine	Repressioon	H2AK119ub1 (Zhou jt, 2008)
Atsetüleerimine	Aktivatsioon	H3K27ac, H3K9ac (Mi jt, 2017)
Metüleerimine	Aktivatsioon	H3K4me1, H3K4me3 (Kusch, 2012)
Metüleerimine	Repressioon	H3K27me3, H3K9me3 (Wiles ja Selker, 2017; Hahn jt, 2011)

Histoonte fosforüleerimist kontrollivad kahte tüüpi ensüümid, millel on vastanduvad funktsioonid. Kinaasid transpordivad ATP fosfaatrühma sihtmärk-aminohappe külge, asendades viimase hüdroksüülrühma. Kuna ATP omab negatiivset laengut, siis see omakorda

annab laengu histoonile, mis mõjutab kromatiini struktuuri. Fosfataasid vastutavad fosfaatrühma eemaldamise eest (Bannister ja Kouzarides, 2011).

Histooni ubikvitineerimine erineb oluliselt teistest modifikatsioonidest, kuna histoonile lisatakse küllaltki suur, 76-aminohappe pikkune fragment (Mercurio jt, 2012). See on pöörduv modifikatsioon, mille stabiilse oleku määravad kaks ensüümi, mis vastutavad fragmendi sidumise ning eemaldamise eest histoonilt (Mercurio jt, 2012). Histoonide ubikvitineerimine mängib olulist rolli paljudes tuuma protsessides, kaasa arvatud transkriptsioon, kromatiini struktuuri säilitamine ja DNA parandamine (Cao ja Yan, 2012).

Histooni atsetüleerimist reguleerivad kaks vastanduva funktsiooniga ensüümi – histooni atsetüültransferaasid (HAT, *histone acetyltransferases*) ja histooni deatsetülaasid (HDAC, *histone deacetylases*) (Bannister ja Kouzarides, 2011). HAT-id katalüüsivad atsetüülühma ülekandmist histooni lüsiinijäägile, mis viib histoonide positiivse laengu kadumiseni ning nõrgendab histoonide sidet negatiivselt laetud DNA-ga (Alhamwe jt, 2018). HDAC-d eemaldavad atsetüülühma histooni lüsiinijääkidelt ning toimivad geeniekspressiooni repressoritena (Alhamwe jt, 2018). H3 histooni 27. lüsiinijäägi atsetüleerimine (H3K27ac) ja H3 histooni 4. lüsiinijäägi monometüleerimine (H3K4me1) on tuntud enhaanseralades paiknemise poolest (Calo ja Wysocka, 2013).

Histooni metüleerimist vahendavad histooni metüültransferaasid ja histooni demetüleerimist viivad läbi histooni demetülaasid (Alhamwe jt, 2018). Histooni metüleerimine leiab aset peamiselt lüsiini- ja arginiinijäägis ning erinevalt atsetüleerimisest ja fosforüleerimisest ei muuda histooni metüleerimine histooni laengut (Bannister ja Kouzarides, 2011). Sõltuvalt metüleerimise asukohast võib see põhjustada geenide aktivatsiooni, nagu H3 histooni 4. lüsiinijäägi trimetümeerimine (H3K4me3) või repressioon, nagu H3 histooni 9. või 27. lüsiinijäägi trimetümeerimine (H3K9me3, H3K27me3) (Shen ja Casaccia-Bonofil, 2008). On teada, et geeni induktsioon vananemise ajal on seotud H3K4me3 kõrgema signaaliga promootoralal, samas H3K4me3 on vajalik paljude geenide normaalse ekspressiooni säilitamiseks kogu eluea jooksul (Cruz jt, 2018). H3K9me3 modifikatsioon märgistab imetaja genoomis enamasti erinevaid heterokromatiini regioone, viidates represserivale funktsioonile (Yan ja Boyd, 2006). H3K27me3 on tihedalt seotud inaktiivsete geeni promootoritega ning samas H3K4me3 modifikatsioon asub tavaliselt aktiivsete geenide promootorites (Barski jt, 2007).

Antud uurimistöös keskenduti kahele histoonimodifikatsioonile – H3K4me3 ja H3K27ac. Varasemalt on näidatud, et loomuliku immuunsuse rakkude stimuleerimine toob kaasa epigeneetilisi ümberkorraldusi histooni metüleerimise ja atsetüleerimise tasemel (Ostuni jt, 2013, Saeed jt, 2014). Antud töid kinnitab ka Bekkering oma tööühmaga, kes stimuleeris ateroskleroosi patsientide monotsüüte β -glükaaniga ning leidsid 500 rikastatud H3K4me3 geeni, mis olid seotud erinevate tsütokiinidega ja kemokiinidega (Bekkering jt, 2013). Niisamuti on näidatud, et pärast lühikest kokkupuudet β -glükaaniga, BCG-ga või oxLDL-ga iseloomustab treenitud makrofaagide fenotüüpi aktiivse histooni H3K4me3 ja H3K4me1 modifikatsioonide rikastumine (Leentjens jt, 2018). Hoeksema ja Winther viisid läbi katseid stimuleerides monotsüüte ja makrofaage LPS-ga ning nägid, et tänu treenimisele kromatiin muutub avatuks nii H3K27ac kui ka H3K4me3 modifikatsioonidega rikastatud genoomialades (Hoeksema ja Winther, 2016). Sarnaseid tulemusi oli näidatud ka varem, mil monotsüüte treeniti β -glükaaniga ning transkriptsiooniline ja epigeneetiline analüüs H3K4me3 ja H3K27ac põhjal näitas metaboolsetes radades osalevate geenide indutseerimist (Saeed jt, 2014; Cheng jt, 2014).

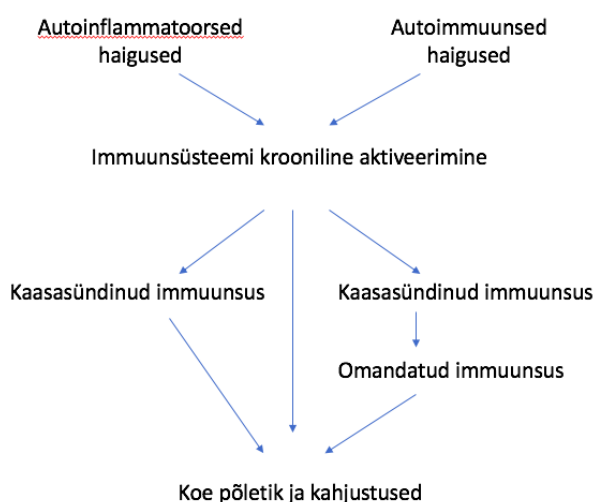
1.4 Autoimmuunsed ja autoinflammatoorsed haigused

Autoimmuunhaigus (AD, *autoimmune disease*) on krooniline haiguslik seisund, mida iseloomustab immuunsüsteemi rakkude rünnak enda keha rakkude vastu. Paljud autoimmuunhaigused on tugevalt seotud geneetiliste, nakkuslike ja keskkonnast sõltuvate teguritega (Smith ja Germolec, 1999). Haigused varieeruvad suuresti erinevates organites ja nende kliinilistes ilmingutes, mõned on piiratud teatud kudedega ning teised on süsteemsed (Rosenblum jt, 2015). Ajalooliselt peeti autoimmuunhaigusi haruldasteks, kuid epidemioloogilised uuringud on tänaseks näidanud, et nad mõjutavad 3-5% elanikkonnast (Wang jt, 2015). Lisaks autoimmuunhaigustele eristatakse ka autoinflammatoorsed haigusi (AID, *autoinflammatory disease*). AID on harvaesinevate pärilike põletikuliste häirete rühm, mille puhul ei esine infektsioone ning loomuliku immuunsuse rakud võivad indutseerida infektsiooni isegi siis, kui antigeenid ei ole organismi sisse tunginud (Touitou ja Koné-Paut, 2008). Üheks nende erinevuseks on see, et autoinflammatoorsed haigused põhjustavad põletikku otseselt läbi kaasasündinud immuunsüsteemi, ilma adaptiivse immuunsuse aktiveerimiseta (joonis 3). Nende kahe haigusgrupi võrdlus on toodud tabelis 3.

Tabel 3. Autoinflammatoorsete ja autoimmuunsete haiguste erinevused

Omadused	Autoimmuunne	Autoinflammatoorne
Immuunreaktsiooni tüüp	Peamiselt omandatud	Peamiselt kaasasündinud
Autoantikehad	On diagnostilised või osalevad patogeneesis	Enamasti puuduvad
Ravi	Immuunosupresseeriv ravi. B ja T rakke elimineeriv bioloogiline ravi	Tsütokiine blokeeriv ravi (nt. antikehad IL-1, TNF, IL-6 vastu)
Põhilised patogeneesis osalevad rakud	B- ja T-rakud	Neutrofiilid, makrofaagid
Kontseptuaalne arusaamine	Enda tolerantsuse murdumine	Koespetsiifilised tegurid; ohusignaalid

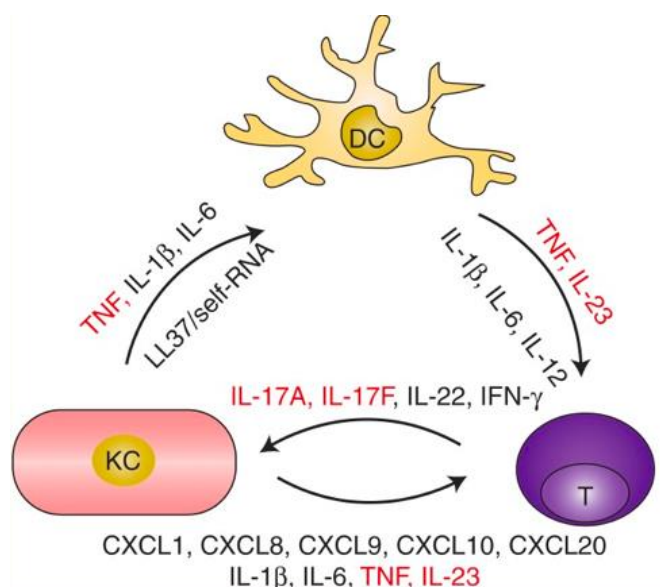
Nad jagavad mõningaid ühiseid omadusi, nagu iseenda vastu suunatud patoloogiline protsess, millega võib kaasneda süsteemne kahjustus (Doria jt, 2012). Nende erinevus seisneb selles, et AID-de korral põhjustab kaasasündinud immuunsüsteem otseselt kudede põletikku, samas kui AD-des aktiveerib kaasasündinud immuunsüsteem omandatud immuunsüsteemi, mis omakorda vastutab põletikulise protsessi eest (Doria jt, 2012). Antud magistritöös uuriti kahte põletikulist haigust – psoriaas ja süsteemne erütematoosne luupus. Antud haiguste kirjeldused on toodud punktides 1.4.1 ja 1.4.2.



Joonis 3. Autoimmuun- ja autoinflammatoorsete haiguste aktiveerimise rajad. Autoinflammatoorsed haigused põhjustavad kudede põletikku otseselt läbi kaasasündinud immuunsüsteemi, kuid autoimmuunhaigused aktiveerivad esiteks kaasasündinud immuunsüsteemi, mis omakorda aktiveerib adaptiivset ehk omandatud immuunsust (muudetud Doria jt, 2012).

1.4.1 Psoriaas

Psoriaas on suhteliselt levinud krooniline põletikuline nahahaigus, mis esineb 1-3% maailma elanikkonnast (Ayala-Fontánez jt, 2016). Arvestades nahakahjustuste nähtavust, kaasa arvatud näo, peanaha, käte ja küünte kahjustusi, on psoriaas tõsine füüsiline ja psühholoogiline koormus patsiendi jaoks (Furue jt, 2018). Psoriaasi ei ole ainult nahahaigus, vaid süsteemne põletikuline protsess. Sellele viitab erinevate haiguste (südame-veresoonkonna haigused, rasvumine, diabeet, metaboolne sündroom, vähk, ärevus, depressioon ning põletikuline soolehaigus) suurem esinemissagedus võrreldes üldpopulatsiooniga (Ni ja Chiu, 2014). Kliiniliselt klassifitseeritakse psoriaas kahte rühma: mitte-pustulaarne ehk *Psoriasis vulgaris*, mis on kõige sagedamini täheldatav kliiniline vorm (ligi 90%) ning pustulaarne psoriaas (Sarac jt, 2016). Ligikaudu 10-30% psoriaasiga patsientidel areneb psoriaatiline artriit (Krueger ja Bowcock, 2005). Psoriaasil ja ateroskleroosil on ühine Th1 ja Th17 tsütokiinide ülesreguleerimine, T-rakkude aktiveerimise ning adhesioonimolekulide ja endoteelide ekspressiooni muster (Ni ja Chiu, 2014). Põletiku piirkondade läheduses aktiveeritud T-rakud toodavad 1. tüüpi tsütokiine, nagu interferoon (IFN)- γ , mis inhibeerib apoptoosi, interleukiin (IL)-2, mis stimuleerib T-rakkude proliferatsiooni ning tuumori nekroosi faktor (TNF, tumor necrosis factor)- α , mis aktiveerib ja suurendab keratinotsüütide proliferatsiooni (Ni ja Chiu, 2014) (joonis 4). Kuna haiguse tekkepõhjused ei ole tänapäeval teada, pole võimalik patsientidel haigust välja ravida, kuid haiguse sümptomeid on võimalik hoida kontrolli all tänu erinevatele ravimitele.

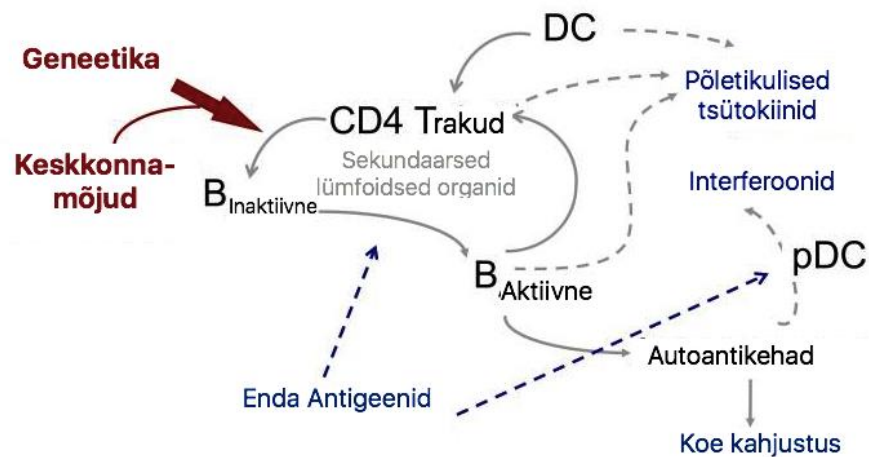


Joonis 4. Psoriaasi immuunopatogenees. KC ehk keratinotsüüdid toodavad peamiselt tsütokiine nagu TNF, IL-1 β ja IL-6 ning samuti valku LL37, mis aktiveerivad dermise dendriitrakke (DC). Aktiveeritud DC-d sekreteerivad mediaatoreid nagu TNF, IL-23, IL-1 β , IL-6, mis viib IL-17 tootvate T-rakkude diferentseerumiseni ja aktiveerumiseni. T-rakud sekreteerivad tsütokiine nagu IL-17A, IL-17F, IL-22, IFN- γ , mis aktiveerivad KC diferentseerumise ja indutseerivad täiendavate põletikuliste vahendajate (kemokiinid CXCL1 ja CXCL8) abil neutrofiilide ja teiste immuunrakkude värbamist (CXCL9, CXCL10, CXCL20). Punasega on näidatud kriitilised proinflammatoorsed molekulid, mis on bioloogiliste ravimite märklauadeks (Meglio jt, 2014).

1.4.2 Süsteemne erütematoosne luupus

Sarnaselt paljudele teistele autoimmuunhaigustele iseloomustavad süsteemset erütematoosset luupust (SEL, *lupus erythematosus systemicus*) ülemäärase B- ja T-rakkude vastused ning immuunotolerantsuse kadumine enda antigeenide vastu (Anaya jt, 2014). Haiguse kliiniline pilt on väga keeruline, kuna haigus on multisüsteemne ja võib olla ettearvamatu, põhjustades mitmete organite kahjustust (Gergianaki ja Bertsias, 2018). SEL esineb sagedamini mittevalgetes populatsioonides ning ligikaudu 90% patsientidest on naised (González jt, 2014; Fessel, 1974). SEL-i etioloogia on teadmata, kuid on kaasatud mitmeid geneetilisi, epigeneetilisi ja keskkonna tegureid (Kamen, 2014). Haiguse sümptomiteks on nahalööbed (näo „liblikas“), suuõõne haavandid, artriit, neuroloogilised ilmingud (psühhoos, krambid) ning samuti vererakkude kahjustused nagu hemolüütiline aneemia, leukopeenia ja trombotsütopeenia (Moulton jt, 2017). Kuigi SEL-i puhul on häiritud ka T-rakulised reaktsioonid, siis hiljutised andmed viitavad sellele, et B-rakkude sisemine kalduvus

reageerida ülemäära immuunstimulatsioonile võib olla SEL-i oluliseks tunnuseks (Lipski, 2001; Grammer jt, 2001). Ka häiritud kaasasündinud immuunvastus mängib olulist rolli SEL-i patogeneesis, soodustades põletikuliste tsütokiinide vabanemist ning ka autoreaktiivsete T- ja B-rakkude ebanormaalset aktiveerumist, mis viib patogeensete autoantikehade tekkeni ja organi kahjustumiseni (Craft, 2011) (joonis 5).



Joonis 5. Autoantikehade tootmise mehhanism. Autoreaktiivsete B-rakkude ja CD4+ T-rakkude aktiveerimine sekundaarsetes lümfoidorganites põhjustab patogeensete autoantikehade tootmist, mis koos põletikuliste tsütokiinidega soodustavad kudede kahjustumist. Antigeeni esitlevad dendriitrakud on vajalikud adaptiivsete immuunrakkude aktiveerimiseks ning soodustavad põletikuliste tsütokiinide tootmist. Geneetiline eelsoodumus ja keskkonnamõjud on samuti põhjuseks ebanormaalse immuunsüsteemi aktivatsiooni jaoks. Lühendid: DC – dendriitrakk, pDC – plasmatsütoidne dendriitrakk (muudetud Choi jt, 2012).

2. EKSPERIMENTAALOSA

2.1 Töö eesmärgid

Hüpotees: Krooniline põletik põhjustab monotsüütides epigeneetilisi muutusi, mis omakorda võimendavad põletikulist protsessi.

Eksperimentaalse töö eesmärgid:

1. Stimuleerida psoriaasi patsientide, SEL patsientide ja kontrollisikute monotsüüte ligandidega, mis indutseerivad põletikumediaatorite produktsiooni, ning hinnata võrdlevat geeniekspressiooni patsientide ja kontrollisikute rakkudes kasutades kvantitatiivset PCR meetodit.
2. Uurida aktiivsele kromatiinile iseloomuliku histoonimodifikatsiooni H3K27ac rikastumist kromatiini immuunopretsipitatsiooni meetodil psoriaasi patsientide, SEL patsientide ja kontrollisikute monotsüütides.

2.2 Materjal ja metoodika

2.2.1 Valim

Antud töös uuriti 15 patsienti (keskmine vanus 55,7 aastat; SD = 16,803; 7 meest ja 8 naist), kellel oli diagnoositud psoriaas, ning 5 patsienti SEL haigusega (keskmine vanus 35,6 aastat; SD = 20,166; 1 mees ja 4 naist). Võrdluseks oli 18 tervet kontrollisikut (keskmine vanus 53,6; SD = 16,331; 10 meest ja 8 naist). Terved kontrollid kutsuti uuringusse Nahahaiguste Kliiniku patsientide hulgast, kes tulid kergematele protseduuridele ja ei põdenud kroonilisi põletikulisi haigusi. Uuringul on Eestikakomitee luba 270/T-9 ning kõik uuritavad allkirjastasid informeeritud nõusoleku vormi.

2.2.2 Perifeerse vere mononukleaarsete rakkude eraldamine verest

Patsientidelt ja kontrollisikutelt võeti 3 katsutit verd. Patsiendi ja kontrollisikute perifeersed vere mononukleaaarsed rakud (*peripheral blood mononuclear cell*, PBMC) eraldati vere leukotsüütide kihist. Leukotsüüdi kihi saamiseks kasutati Ficoll-i gradiendis

tsentrifuugimist. 30 ml verd segati 50 ml-ni PBS-ga (*phosphate buffered saline*) (Lonza, BioWhittaker). Kahte 50 ml tuubi põhja pipeteeriti 10 ml Ficoll-Paque PLUS lahust (GE Healthcare Bio-Science AB) ning mõlemasse tuubi pipeteeriti ettevaatlikult Ficoll-lahusele peale 25 ml vere-PBS-i segu. Proovid tsentrifuugiti (5810 R, Eppendorf) pidurduseta 30 minutit 400 x g toatemperatuuril. Peale tsentrifuugimist eraldati vereplasma ning Ficolli kihtide vahelt ettevaatlikult mononukleaarsete rakkude fraktsioon ja tõsteti pipetiga uude 50 ml tuubi. Rakkude pesemiseks lisati tuubi 50 ml-ni PBS-i ning tsentrifuugiti 10 min 200 x g, pesu korralti kaks korda. Lõpus eemaldati pealt PBS ja lisati külmutussööde (10% DMSO FBS-s). Rakkude säilitati vedelas lämmastikus.

2.2.3 Monotsüütide ehk CD14⁺ rakkude eraldamine

CD14⁺ rakkude eraldamine PBMC-dest viidi läbi spetsiifiliste magnetkeradega *Dynabeads Human T-Expander CD14* (Gibco, Life Technologies) vastavalt tootja protokollile. Perifeerse vere mononukleaarset rakud suspendeeriti 30 ml PBS-is, kust 20 ml läks isoleerimiseks ning 10 ml külmutamiseks. Mõlemad tuubid tsentrifuugiti 10 min 300 x g 8°C, imuriga eemaldati supernatant ja rakke suspendeeriti RB puhvril (*100 ml (0,5%) BSA + 4 ml (2mM) EDTA + 900 ml PBS*) tihedusega 10⁷ rakku /80 µl puhvrit. Seejärel lisati CD14 mikrokerad tihedusega 10⁷ rakku / 20 µl keraid ning inkubeeriti pimedas 15 min 8°C. Peale inkubatsiooni pesti keradega inkubeeritud rakke 10 ml RB puhvril ja tsentrifuugiti 7 min 300 x g, viimaks eemaldati supernatant. MACSiMAG Separator (Milenyi Biotech) magnetilusele asetati MS kolonn. Kolonnile lisati 1 ml külma RB puhvrit. Kolonni alla asetati 15 ml falcon. Rakud suspendeeriti 1 ml RB puhvril ja rakuksuspensioon pipeteeriti MS kolonnile. Kui vedelik oli läbi tilkunud, lisati juurde 500 µl RB 3 korda. Seejärel eemaldati kolonn magnetiluselt ning puhtale falconile asetades lisati 2 ml RB puhvrit, vedeliku läbi kolonni surudes koguti falconisse CD14⁺ rakud ehk monotsüüdid.

2.2.4 Rakkude stimuleerimine TLR ligandidega

1,5 miljonit monotsüüti tõsteti kolme stimulatsiooni jaoks tuubi, 500 000 ühe stimulatsiooni kohta. Tuubid tsentrifuugiti 300 x g 4 min 8°C, seejärel eemaldati supernatant ettevaatlikult ja resuspendeeriti 600 µl RPMI 1640 (Gibco, Life Technologies) söötmes. Söötmesse lisati 5 ml penitsilliin/streptomütsiini segu ja 5 ml 100 mM puruvaati. Rakususpensioon jagati 200 µl kaupa polüpropüleenist tuubidesse:

1. Negatiivne kontroll – stimuleerimata proov, kuhu lisati 200 µl söödet
2. Ultrapure LPS (10 ng/ml) (InvivoGen)
3. Ultrapure LPS (10 ng/ml) (InvivoGen) + Pam3CSK4 (200 ng/ml) (InvivoGen)

Rakke inkubeeriti CO₂ inkubaatoris 24 tundi. Järgmisel päeval tõsteti rakud uutesse 1,5 ml tuubidesse ja tsentrifuugiti 400 rcf 8°C 5 min. Supernatant eemaldati ning rakusade resuspendeeriti 500 µl QIAzol Lysis Reagent (Qiagen). Rakud säilitati -80°C ja supernatandid -20°C külmkappides.

2.2.5 Proovide RNA eraldamine ja cDNA süntees

RNA eraldati patsiendi ja kontrollisikute stimuleeritud ja külmutatud rakkudest, kasutades RNeasy Mikro Kit komplekti (Qiagen) vastavalt tootja protokollile. RNA kontsentratsioonid mõõdeti NanoDrop ND-1000 spektrofotomeetriga (NanoDrop Technologies). RNA säilitati -80°C juures.

cDNA sünteesi jaoks kasutati *SuperScript* III pöördtranskriptaasi (Invitrogen). Ühe proovi kohta võeti 1 µl 10 mM dNTP segu (Fermentas), 1 µl 500 µg/ml oligo(dT)₂₀ praimerit (Invitrogen) ja 13 µl totaalset RNA-d. Järgmise sammuna proove inkubeeriti 5 min 65 °C juures, et praimerid saaksid seonduda RNA-le (RNA lineariseerimiseks). cDNA sünteesiks segati kokku ensüümi segu : iga proovi kohta 4 µl 5 x First Strand puhvrit, 1 µl 0,1 M DTT, 1 µl ribonukleaasi inhibiitorit *RiboLock* (40U/ µl) (Fermentas) ja 1 µl *SuperScript* III (200 U/ µl). Ensüümi segu resuspendeeriti ja jagati proovidele laiali. Proove inkubeeriti 1 h 50 °C juures, ning seejärel inkubeeriti 15 min 70 °C juures, et lõpetada reaktsioon. Saadud cDNA hoiti -20°C juures.

2.2.6 Ekspressioonianalüüs

Ekspressioonianalüüsi jaoks kasutati seitse erinevat ekspressiooni praimerit, mis olid disainitud Primer-BLAST programmiga ning tellitud firmast Metabion International AG. Praimerite järjestused on toodud tabelis 4.

Tabel 4. Ekspressiooni praimerite järjestused.

Geen	<i>Forward</i> praimer	<i>Reverse</i> praimer
βACT	CTGGAACGGTGAAGGTGA	CGGCCACATTGTGAACTT
TNF	CCCATGTTGTAGCAAACC	AGGACCTGGGAGTAGATG
IL6	AGGCACTGGCAGAAAACAACC	ACCAGGCAAGTCTCCTCATTGAA
IL1B	CCCTGCAGTGGTTCGAGG	GCTGCTTCAGACACTTGCAC
IL8	GAGAGTGATTGAGAGTGG	GAATTCTCAGCCCTCTTC
MCP-1	CCAGTCACCTGCTGTTATAAC	TGGAATCCTGAACCCACTTCT
MMP8	ACCAAAGAGATCACGGTGACA	TCCATGTTTCTTCGGCATCAAAA

Antud magistritöös kasutati pöördtranskriptsiooni polümeraasi ahelreaktsiooni (RT-PCR, *reverse transcription polymerase chain reaction*), mille eesmärk oli tuvastada kõrgemalt ekspresseerunud alasid patsientide ja kontrollisikute stimuleeritud rakkudes. Reaktsioon viidi läbi Viia 7 masinaga (Applied Biosystems) 384-aluselisel mikrotiiterplaadil.

Ühe qPCR reaktsioonisegu kogumahuks oli 30 µl, mis sisaldas:

	Maht	Kontsentratsioon
<i>Maxima™ SYBR Green/ROX qPCR Master Mix</i> (Fermentas)	16,3 µl	2x
MQH ₂ O	14,6 µl	
<i>Forward</i> ja <i>reverse</i> praimerisegu	1,5 µl	5 mM

Reaktsioonisegu segati 1 µl DNA-ga ning seejärel jagati 10 µl kaupa plaadile. Kontaminatsiooni kontrolliks kasutati MQH₂O.

qPCR programmietapid:

Polümeraasi aktivatsioon	95 °C 10 min	} 45 tsüklit
Denaturatsioon	95 °C 15 sek	
Praimerite seondumine	60 °C 1 min	
Produkti paljundamine	60 °C 1 min	
Dissotsiatsiooni etapp	95 °C 15 sek	

Sellele järgnes inkubatsioon 1 min 60 °C juures ning 1 tsükel sulamiskõvera analüüsi jaoks. Saadud tulemused analüüsiti võrdleva Ct meetodiga, mille puhul kasutati valemit $2^{-\Delta Ct}$ (Livak & Schmittgen, 2001). Normaliseerimiseks kasutati koduhoidja geeni β-ACT ning seejärel normaliseeriti vastavalt stimuleerimata rakupopulatsiooni ΔCt väärtuse suhtes.

2.2.7 Kromatiini immunopretsipitatsioon

2.2.7.1 Ristsidemete moodustumine

CD14⁺, CD8⁺ ja CD4⁺ rakud tsentrifuugiti põhja 300 x g 10 min 8 °C, seejärel eemaldati supernatant ning lisati 1 ml PBS (*phosphate buffered saline*) (Lonza, BioWhittaker). Rakkudele lisati 100 µl 11% formaldehüüdi lahust (50 mM Hepes-KOH, pH 7.3, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.5 mM EGTA, 11 % Formaldehyde, MQH₂O), mille tulemusena moodustusid ristsidemed DNA ja valkude vahel. Tuube segati ning lasti seista toatemperatuuril 10 min. Selleks, et peatada edasist ristsidemete moodustumist, lisati rakkudele 110 µl 1,25 M glütsiini (AppliChem), tuube segati ning lasti seista 7 min toatemperatuuril. Seejärel tsentrifuugiti 1000 x g 4 min 8 °C. Tuube hoiti jääl. Peale tsentrifuugimist eemaldati supernatant ning rakud pesti 2 korda 1 ml külma PBS-iga, millele järgnes tsentrifuugimine 1250 x g 4 min 8 °C. Supernatant eemaldati ja rakud kiirkülmutati vedelas lämmastikus. Proovid säilitati -80 °C juures.

2.2.7.2 Rakkude lüüsimine ja kromatiini sonikeerimine

Proovid võeti -80 °C juurest ning sulatati jääl 15 min. Seejärel resuspendeeriti aeglaselt 500 µl NCP I (10 mM EDTA, 0,5 mM EGTA, 0,25% Triton X-100, MQH₂O + 10 mM Na-butüraat, proteaasi inhibiitor (*HaltTM Protease Inhibitor Cocktail, EDTA-free (100X)*, Thermo Fisher Scientific)) puhvrts. Proove tsentrifuugiti 7 min 1000 x g 8 °C juures ning supernatant eemaldati. Järgnevalt resuspendeeriti rakke 500 µl NCP II (1 mM EDTA, 0,5 mM EGTA, 10 mM Hepes, pH 6.5, 200 mM NaCl, MQH₂O + 10 mM Na-butüraat, proteaasi inhibiitor) puhvrts. Proove tsentrifuugiti 7 min 1000 x g 8 °C juures. Peale tsentrifuugimist eemaldati supernatant ja rakke resuspendeeriti 115 µl lüüsipuhvrts (10 mM EDTA, 20 mM Tris-HCl, pH 8.1, 0,5 % NP-40, 0,5 % SDS, MQH₂O + Na-butüraat, proteaasi inhibiitor). Proove inkubeeriti toatemperatuuril 10 min. Sonikeerimine viidi läbi Bioruptor UCD-200 sonikaatoriga (Diagenode), mis töötab 10 min tsüklitena (30 sek *On* ja *Off*) ning kõrgeima võimsuse juures (*High*, 200 W). Proove sonikeeriti 24 minutit ning iga 10 minuti tagant jahutati masinat jääga ja proove tsentrifuugiti lühidalt 10 s 2000 x g.

2.2.7.3 Antikehade ning magnetkerade ettevalmistamine

Selles etapis kasutati Dynabeads M-280 magnetkerasid (Sheep anti-Rabbit IgG, Life Technologies), mis peavad kinnituma antikehadega enne kromatiiniga seondumist. 1 miljon rakku kasutati ChIP katseks, millest 20 % kasutati inputiks ning iga antikeha jaoks kasutati

4x10⁵ rakku. Magnetkerad pipeteeriti 3 µl kaupa 0,2 ml tuubidesse, millele lisati 200 µl BSA blokeerimislahust (0,25 g Probumin (Bovine Serum Albumin, BSA) ning 50 ml PBS). Seejärel asetati tuubid magnetlusele, et magnetkerad kinnituksid tuubi seinale. Supernatant eemaldati ning BSA pesu korral kolma korda. Viimaks resuspendeeriti magnetkerasid 20 µl BSA blokeerimislahuses. Antikehadeks olid histoonimodifikatsiooni markerid H3K4me3 (Millipore, 07-473) ning H3K27ac (Abcam, ab4729). 0,2 ml tuubidesse lisati 98 µl BSA blokeerimislahust ning 2 µl 1 µg/µl antikeha. Tuube segati ning tsentrifuugiti lühidalt 5 s 1000 x g.

2.2.7.4 Kromatiini ettevalmistamine ja immunopretsipitatsioon

Pärast sonikeerimist tsentrifuugiti proove 10 min maksimaalsel kiirusel 8 °C. 10 µl rakke eraldati *input* proovi jaoks 0,2 ml tuubi koos 90 µl elueerimispuhvriga (10 mM Tris, pH 8.0, 1 mM EDTA, 1% SDS, MQH₂O) ning hoiustati -20 °C juures. Supernatandis olev kromatiin jagati 50 µl kaupa kahte tuubi (H3K4me3 ning H3K27ac antikehade jaoks). Igale proovile lisati 100 µl TE puhvrit (10 mM Tris-Cl, pH-8.0, 1 mM EDTA, pH-8.0) ja 50 µl Triton X-100 puhvrit (1 % Triton-X-100, 0.1 % DOC, 1 x proteaasi inhibiitor, 1 x TE).

Immuunopretsipitatsiooni jaoks kasutati ChIP IP-Star masinat (SX-8G, Diagenode). Masinasse asetati kümme rida 0,2 ml tuube, mis sisaldasid eelnevalt ettevalmistatud puhvreid: RIPA puhver (50 mM Hepes-KOH, pH 7.6, 500 mM LiCl, 1 mM EDTA, 1 % NP-40, 0.7 % DOC, MQH₂O + proteaasi inhibiitori kokteil), BSA blokeerimislahus, magnetkerad, kromatiini segu, antikehade segu ja elueerimispuhver. Masin jooksutati programmiga „*ChIP Ipure 16 200 vol*“. Pärast programmi lõppemist inkubeeriti ChIP ning *input* proovid IP-Star masinas 4 h 65 °C juures. Inkubatsiooni möödudes tõsteti ChIP proovid magnetlusele ning supernatant eraldati uude tuubi. Proove töödeldi 5 µl 500 U/ml RNAasiga (Rnase Cocktail Enzyme Mix, Ambion, Life Technologies) kasutades termomikserit (Provocell Microplate Shaker, ESCO) 1 h 37 °C 700 rpm juures. Seejärel lisati proovidele 5 µl 10 mg/ml Proteinaas K (Thermo Scientific) ning inkubeeriti termomikseris 1 h 55 °C 700 rpm juures. DNA puhastamiseks kasutati *MinElute PCR Purification Kit (Qiagen)* vastavalt tootja protokollile.

2.2.8 ChIP-i proovide qPCR analüüs

Kvantitatiivse polümeraasi ahelreaktsiooni eesmärk oli tuvastada immuunosadestatud alade rikastust võrreldes kogu kromatiiniga (*input* proov) patsiendi- ja kontrollisikute rakkudes. Analüüsil kasutati neli ChIP-i praimerit, mis on välja toodud tabelis 5. qPCR-i

meetod on kirjeldatud peatükis 2.2.6. qPCR-i tulemusi analüüsiti võrdleva Ct meetodiga, kasutades valemit $2^{-\Delta Ct}$ ja normaliseerides proovid *inputi*-i põhjal (% *input*-st).

Tabel 5. ChIP-i praimerite järjestused

Geen	Forward praimer	Reverse praimer
B2M	CTCTCTCGCTCCGTGACT	GCCGAAAGGGGCAAGTAG
MYOD1	GTAGGAGAGGCGGGAGAA	TAGGTCTGCGAGGGTCTC
CD14	TGCAGGGCATCTAGGGTTCTGTGT	AGTCAACAGGGCATTACCGCC
SOCS1	GGGGCTGGGATTTGCAATGGCT	GGGGCTGGGATTTGCAATGGCT

2.2.10 Raamatukogu ettevalmistamine

Raamatukogu valmistamisel kasutati materjalina ChIP proove, mis saadi patsientide ja kontrollisikute monotsüütidest. Kokku valmistati 29 raamatukogu: 3 input proovi (1 psoriaasi patsient, 1 kontroll ja 1 SEL patsient), 11 psoriaasi patsiente koos H3K27ac antikehaga, 11 kontroll patsiente H3K27ac antikehaga ja 4 SEL patsiente H3K27ac antikehaga. ChIP-i proovidele tehti raamatukogud kasutades komplekti *NEBNext® Ultra™ II DNA Library Prep Kit for Illumina®* (New England BioLabs) vastavalt tootja protokollile. Raamatukogude valmistamiseks võeti hinnanguliselt 2-2,5 ng DNA-d, arvutades vajaliku mahu 1-15 µl.

2.2.11 Sekveneerimine

Raamatukogude sekveneerimine viidi läbi Tartu Ülikooli Eesti geenivaramu tuumiklaboris. Raamatukogu fragmentides sekveneerimiseks vajalike adapterite olemasolu kontrolliti qPCR-i abil kasutades *Kapa Library Quantification Kit-i* (Kapa Biosystems, Woburn, USA). Proovid sekveeriti Illumina HiSeq2500 masinaga (Illumina, San Diego, USA) *NextSeq 550 System High-Output Kit*-ga vastavalt tootja protokollile, kasutades *single-end* 75 bp järjestusi (NEBNext®, New England BioLabs).

2.2.12 ChIP-seq andmeanalüüs

Sekveneerimisandmete ehk toorandmete analüüsi kvaliteedikontroll sooritati programmiga FastQC¹, et kontrollida, kas raamatukogud on töötanud või mitte. FastQC

tulemuste põhjal kasutati programmi Trim Galore², millega eemaldati ebakvaliteetsed lugemid ja nukleotiidid, mille kvaliteedipiir jäi alla 30. Phred score 30 tähendab seda, et ühe nukleotiidi täpsus on 99,9% (ebatäpseid 1/1000 kohta), Phred skoor = $-10\log_{10}P$, kus P on tõenäosus, et sekvenaator määras lugemis oleva nukleotiidi valesti ning samuti eemaldas lugemite lõpust adapterjärjestused. Järgmise sammuna kasutades programmi Bowtie2³ lugemeid joondati referentsgenoomile (GRCh37/hg19). Samtools 1.1 programmiga⁴ filtreeriti joondatud lugemeid, mille MAPQ skoor jäi alla 30 ($MAPQ = -10\log_{10}P$; P – tõenäosus, et joondus on vale) ja millel puudus paariline lugem, kuid aga jäeti alles unikaalseid lugemeid, mis pärinesid DNA fragmentide mõlemast otsast. Järgmise sammuna eemaldati duplikaatjärjestused kasutades Picard komplekti⁵ kuuluva MarkDuplicates programmiga. H3K27ac seondumiskohtade leidmiseks genoomis kasutati programmi MACS2⁶. Valepositiivseid signaale filtreeriti n-ö mustas nimekirjas olevate genoomsete piirkondade suhtes⁷. Saadud seondumiskohti annoteeriti GREAT⁸, MEME-ChIP⁹, ChromHMM¹⁰, Diffbind¹¹ programmidega ning visualiseerimiseks kasutati IGV brauserit¹².

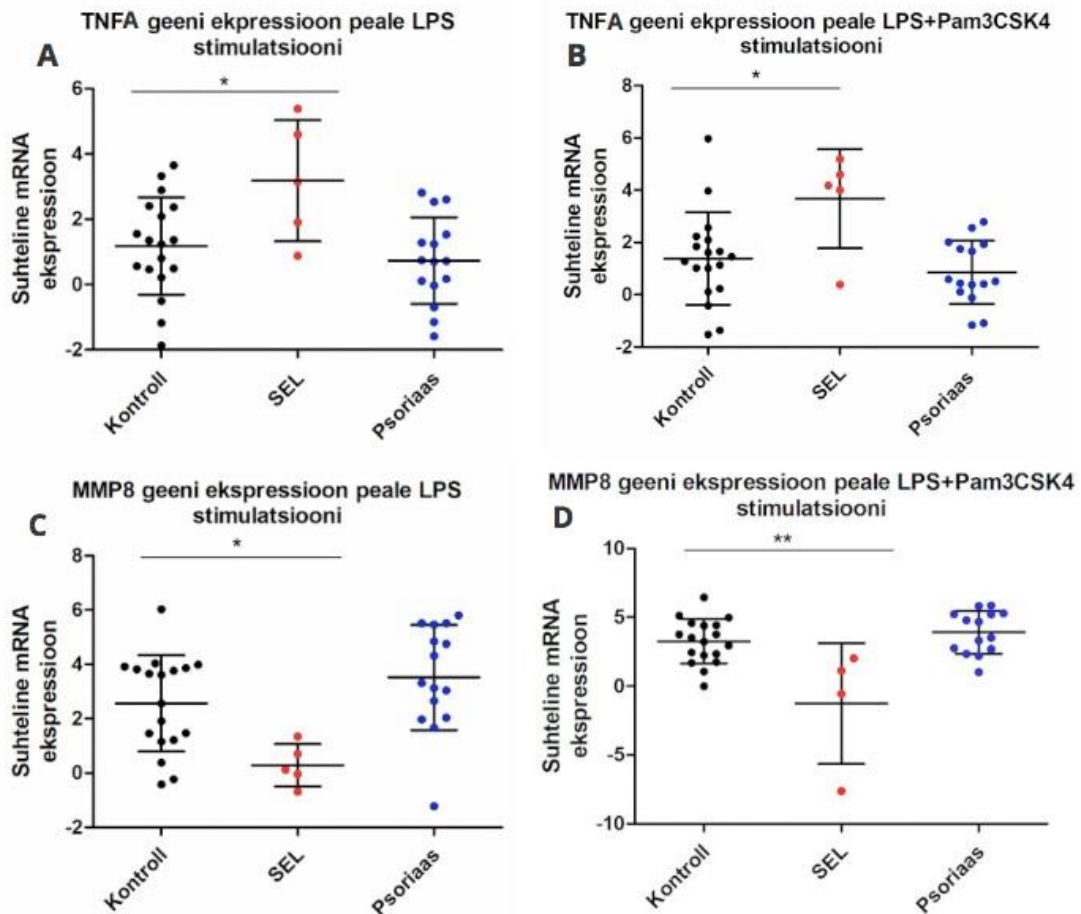
2.2.13 Statistiline analüüs

Ekspressioonianalüüsi graafikutel arvutati kõikide proovide keskmine ja standardhälve. Sooritati kahepoolne t-test programmiga GraphPad Prism (versioon 5.00)¹³. ChIP-i katsete jaoks standarthälvet ei arvatatud, kuna ChIP-i katse qPCR oli läbiviidud ainult katse toimimise kontrolli jaoks. Katseandmete graafikute joonistamiseks kasutati programmi GraphPad Prism (versioon 5.00)¹³.

2.3 Tulemused

2.3.1 Ekspressioonianalüüsi tulemused patsientide ja kontrollisikute stimuleeritud monotsüütides

Patsiendi ja kontrollisikute stimuleeritud monotsüütides kontrolliti põletikuga seotud geenide ekspressioonitasemeid. Rakke stimuleeriti TLR ligandidega LPS või LPS + Pam3CSK 24 tundi koekultuuri inkubaatoris. Seejärel eraldati rakkudest RNA, sünteesiti cDNA ning kontrolliti geenide ekspressioonitasemeid qPCR meetodiga. Määrati *TNFA*, *IL6*, *IL1B*, *IL8*, *MCP-1*, *MMP8* ja *MMP9* ekspressioonitasemeid. Vastavalt ootustele toimus stimuleeritud proovides põletikumediaatorite ekspressiooni tõus võrreldes stimuleerimata kontrollprooviga (lisa 1). Olulist erinevust kontrolliti kasutades *Student's* t-testi. Statistiliselt olulisi erinevusi psoriaasi patsientide ja kontrollisikute monotsüütide vahel ei tuvastatud. Võrreldes SEL patsientide ja kontrollisikute stimuleeritud rakke statistiliselt olulist erinevust andsid geenid *TNFA* (joonis 6 A ja B) ja *MMP8* (joonis 6 C ja D). *TNFA* geeni ekspressioon oli statistiliselt oluliselt kõrgem SEL patsientidel nii LPS stimulatsiooni kui ka LPS+Pam3CSK4 stimulatsiooni korral. Vastupidiselt *TNFA* geeni tulemusele näitas geen *MMP8* SEL patsientide proovides oluliselt madalamat ekspressiooni taset võrreldes tervete kontrollidega.

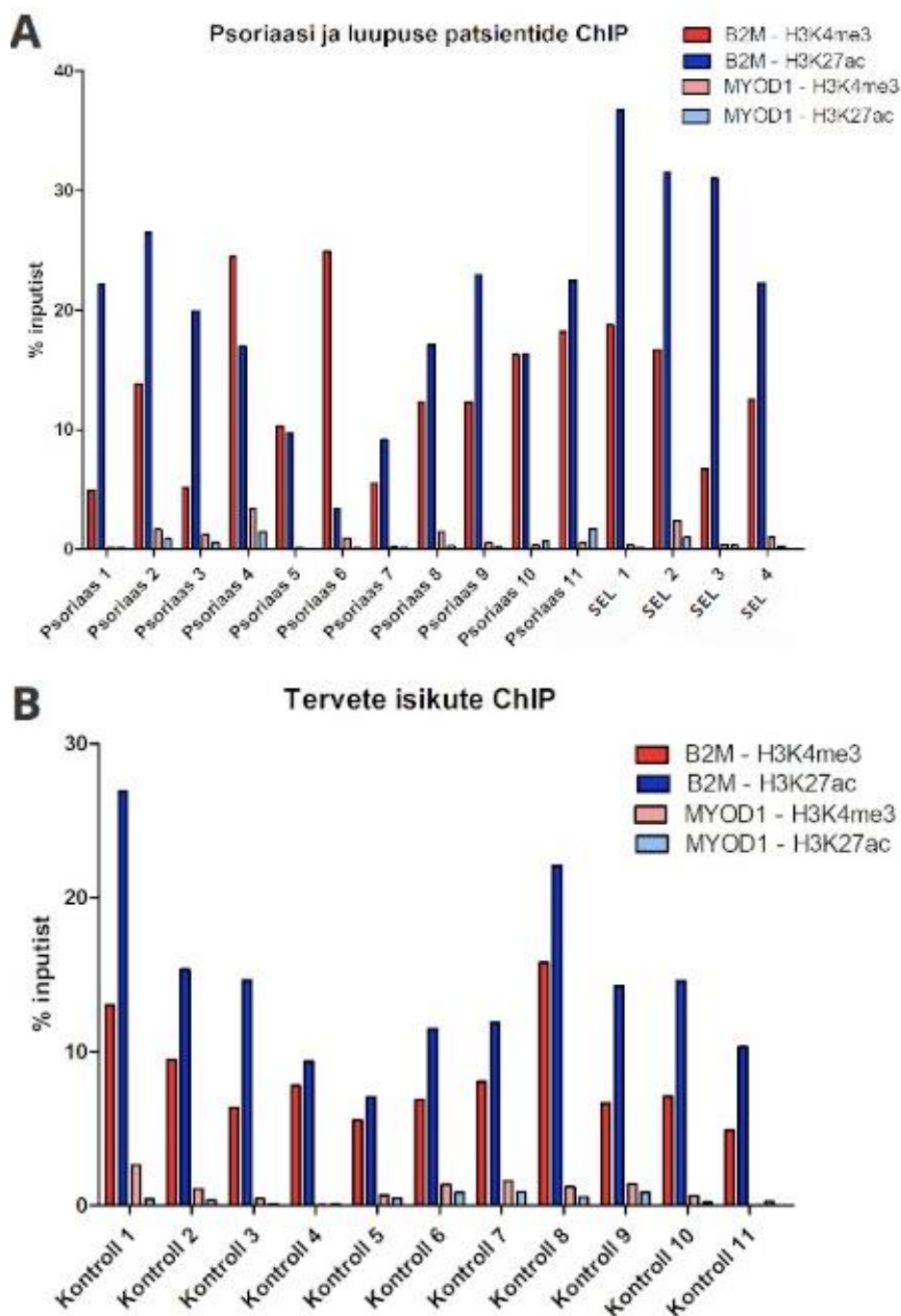


Joonis 6. *TNFA* ja *MMP8* geenide ekspressiooni tasemed pärast LPS ja LPS+Pam3CSK4 stimulatsioone. Kontrollisikute, psoriaasi ja SEL patsientide monotsüüte stimuleeriti LPS-ga või LPS+Pam3CSK4-ga CO₂ inkubaatoris 24 tundi. Graafikutel on y-teljel *TNFA* (A ja B) ja *MMP8* (C ja D) geenide suhteline mRNA ekspressiooni keskmine \pm standardhälve ning x-teljel vastavalt kontroll, SEL ja psoriaasi grupid. Ekspressiooni väärtuste erinevuste statistilise olulisuse hindamiseks p väärtus: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

2.3.2 ChIP-i katse qPCR

ChIP-i (*chromatin immunoprecipitation*) katse tehti 11 psoriaasi patsiendi (keskmine vanus 48,2 aastat; SD = 12,584; 9 meest ja 2 naist, 4 SEL patsiendi (keskmine vanus 41,5 aastat, SD = 13,229; 1 mees ja 3 naist) ja 11 kontrollisiku (keskmine vanus 47,1 aastat, SD = 14,983; 7 meest ja 4 naist) monotsüütidega. Kromatiini fragmente sadestati H3K4me3 ja H3K27ac spetsiifiliste antikehadega ning negatiivse kontrollina kasutati IgG-d. Kasutades qPCR analüüsi, selgitati välja rikastus genoomi kontrollregioonides. Positiivse kontrollina kasutati geeni *B2M* ning negatiivse kontrollina geeni *MYOD1* (joonis 8). *MYOD1* rikastuse

tase on oodatult madal. Selgus, et rikastus on suurem H3K27ac regioonides võrreldes H3K4me3 modifikatsiooni proovidega ning seetõttu otsustati järgnevates katsetes edasi minna ainult H3K27ac ChIP proovidega ning ainult need proovid sekveneeriti (kirjeldatud punktis 2.3.3).

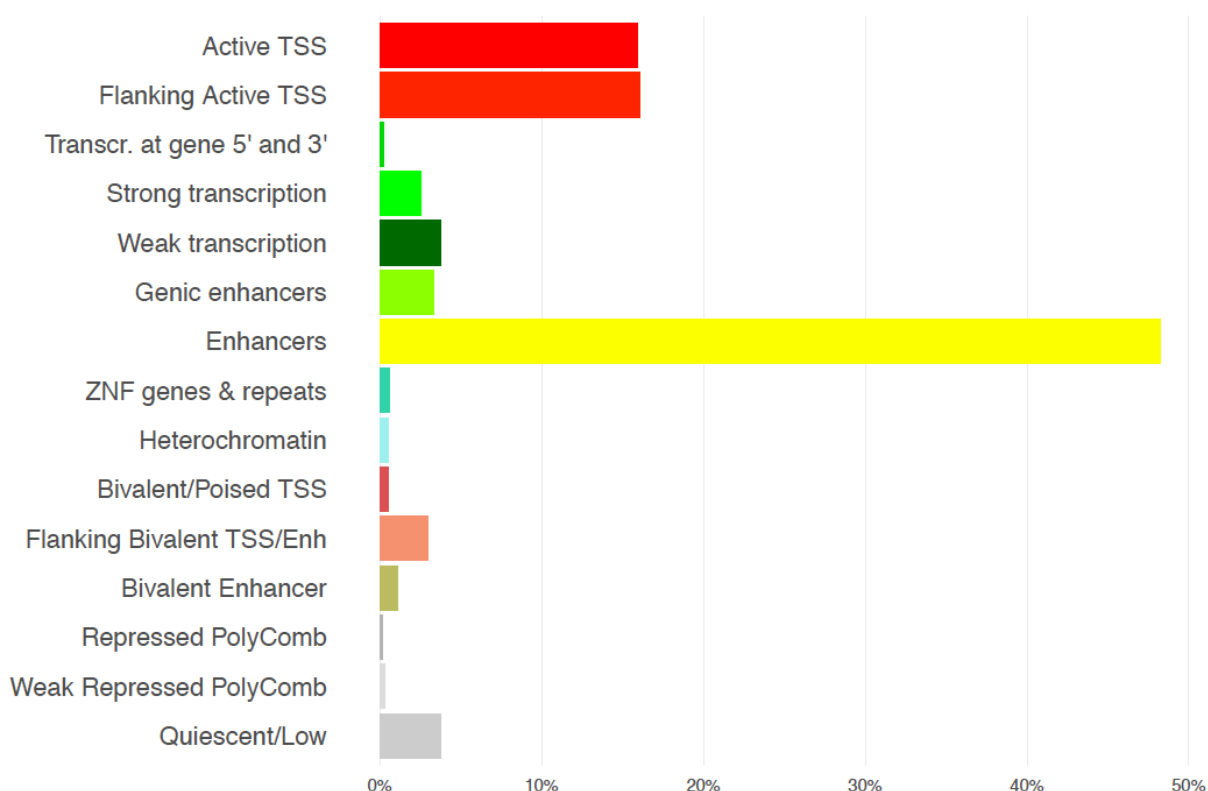


Joonis 8. Psoriaasi ja SEL patsientide ning tervete kontrollisikute ChIP-i katse qPCR.

Katsetes kasutati inimeste monotsüüte ning vaadeldi ChIP proovi rikastust H3K4me3 ja H3K27ac modifikatsiooniga märgistatud genoomi regioonides. Graafiku y-teljel on *B2M* ja *MYOD1* geenide rikastuse tasemed. Proovid olid normaliseeritud *inputi* suhtes.

2.3.3 ChIP-seq ning uuritavate seondumiskohtade kattuvus genoomil

H3K27ac modifikatsiooni seondumiskohtade ülegenoomseks uurimiseks oli vaja sekveneerida ja analüüsida kromatiini immuunosadestatud materjal. H3K27ac modifikatsiooni seondumiskohtade leidmiseks genoomil võrreldi uuritava immuunosadestatud proovi signaali kõrgust taustaga. Tulemused on toodud välja lisa 2. Et leida seondumiskohtade kattuvus genoomi erinevate piirkondadega võrdlesime oma proove ChromHMM¹⁴ andmebaasist pärit monotsüütide andmestikuga *E124 Monocytes-CD14+ RO01746 Primary Cells*. Võrdlusest leiti, et kõikide proovide seondumiskohad asuvad enamasti enhaanseri alades ja on seotud aktiivse transkriptsiooni alguskohtadega, gruppide omavahelisel võrdlusel esines sarnane kattuvus genoomi erinevates regioonides. Graafikul on näitena toodud välja SEL grupi kattuvus (joonis 8) ning teiste gruppide jaotuvus on leitav lisast (lisa 3).

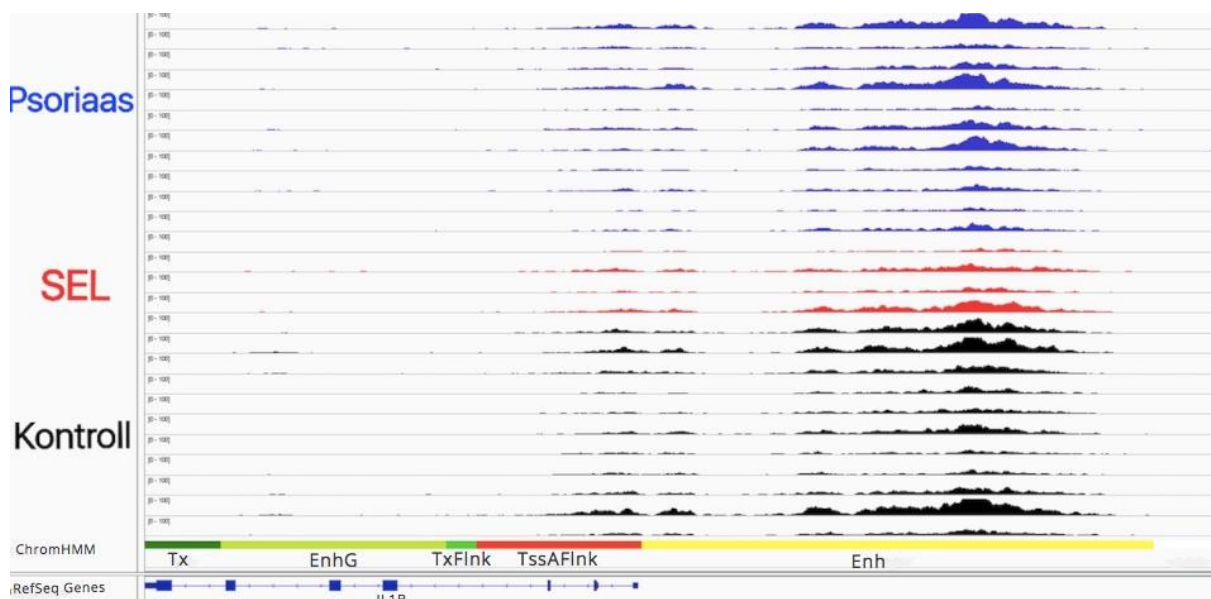


Joonis 8. SEL patsientide H3K27ac seondumiskohtade kattuvus genoomil. H3K27ac seondumiskohtade leidmiseks genoomil kasutati programmi MACS2. Seondumiskohtade kattuvuse uurimiseks võrdlesime proove ChromHMM¹⁴ andmebaasist monotsüütide andmestikuga *E124 Monocytes-CD14+ RO01746 Primary Cells*. Joonisel on x-teljel protsentidega näidatud seondumiskohtade kattuvus erinevate regioonidega. Y-teljel: *Active TSS* – aktiivse transkriptsiooni alguskoht; *Flanking Active TSS* – külgnev aktiivne transkriptsiooni alguskoht; *Transcr. at gene 5' and*

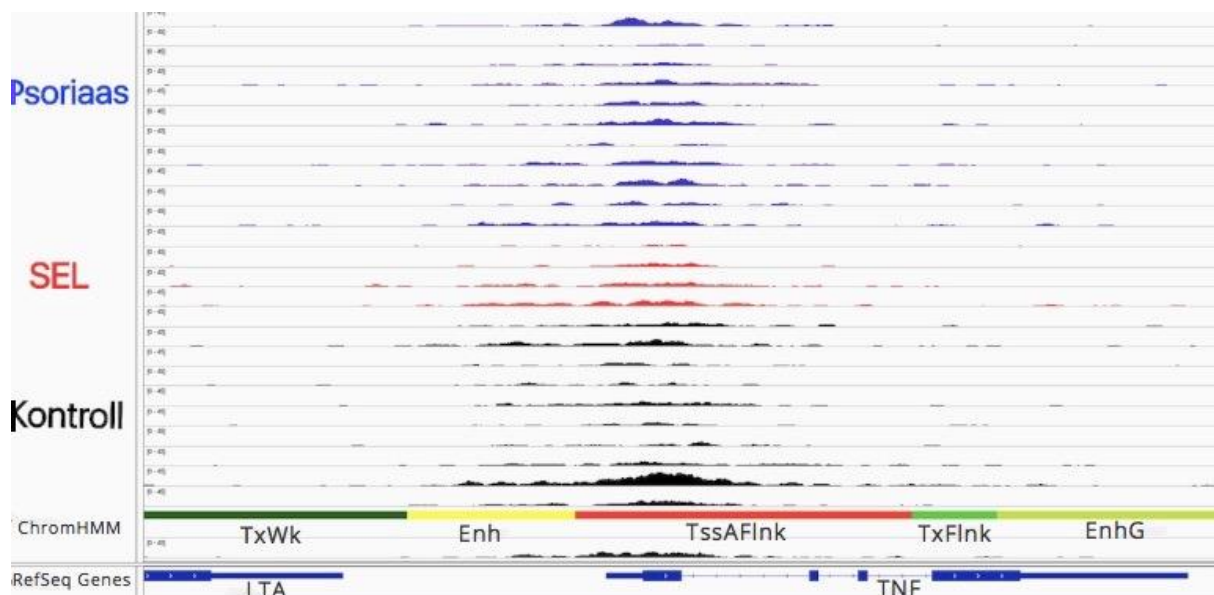
3' – geeni 5' ja 3' otsad; *Strong transcription* – tugev transkriptsioon; *Weak transkriptsioon* – nõrk transkriptsioon; *Genic enhancers* – geeni enhaanser; *Enhancers* – enhaanser; *ZNF genes & repeats* – ZNF geenid ja kordusjärjestused; *Heterochromatin* – heterokromatiin; *Bivalent/poised TSS* – bivalente transkriptsiooni alguskoht; *Flanking Bivalent TSS/Enh* – külgnev bivalentne transkriptsiooni alguskoht/enhaanser; *Bivalent Enhancer* – bivalentne enhaanser; *Repressed PolyComb* – repressseeritud PolyComb; *Weak Repressed PolyComb* – nõrgalt repressseeritud PolyComb; *Quiescent /Low* – madala aktiivsusega ala.

2.3.5 Seondumiskohtade visualiseerimine referentsgenoomil

Seondumiskohtade visualiseerimiseks referentsgenoomil kasutati IGV brauserit. Kõikide proovide puhul oli tugev H3K27ac modifikatsiooni signaal *IL1B* geeni enhaanseri (*Enh*) alas ning lisaks esineb signaal ka külgnevas aktiivse transkriptsiooni alguskohas (*TSSAFlnk*) (joonis 9). Teise näitena on välja toodud *TNF* geenil olevad seondumiskohad, mis annavad madalamat signaali. Kuid on näha, et seondumine on samuti seotud enhaanseri alaga ning geeni transkriptsiooniga (joonis 10).



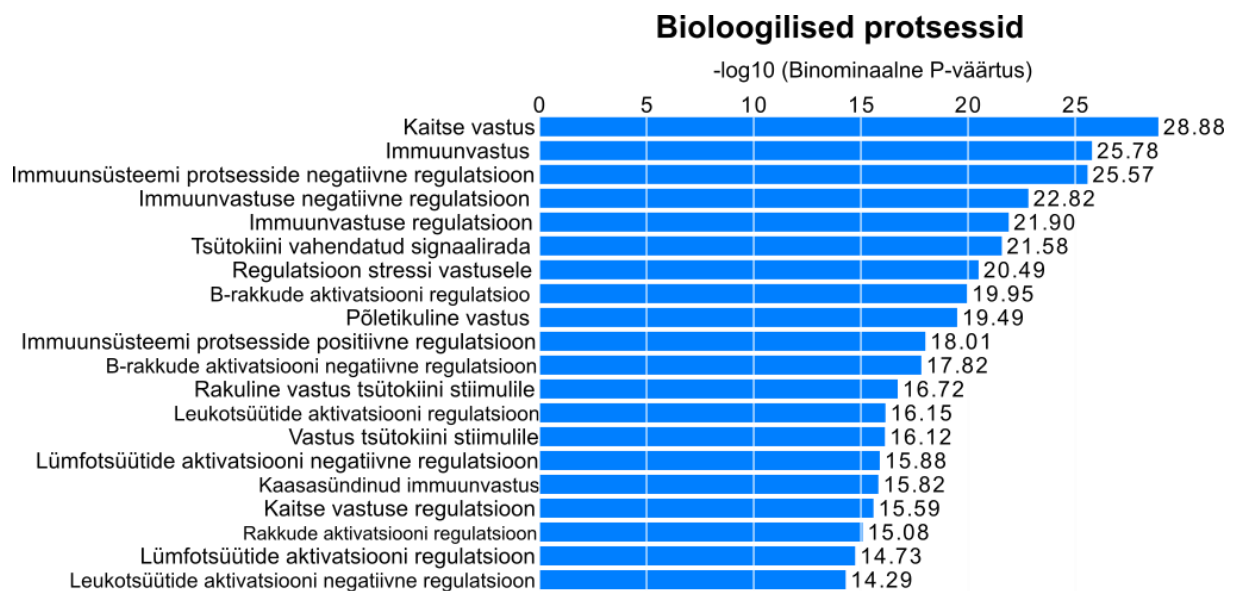
Joonis 9. IGV brauseriga visualiseeriti *IL1B* geeni H3K27ac modifikatsiooni seondumiskohad. Sinise värviga on visualiseeritud psoriaasi patsiendid, SEL patsiendid punasega ja terved kontrollisikud mustaga. Uuritavate seondumiskohtade võrdluseks kasutati andmestikku *E124 Monocytes-CD14+ RO01746 Primary Cells*. Alumised värvid vastavad kromatiini regioonidele nagu näidatud joonisel 8. Enh – enhaanserid (*Enhancers*); TssAFlnk - külgnev aktiivne transkriptsiooni alguskoht (*Flanking Active TSS*); TxFlnk - geeni 5' ja 3' otsad (*Transcr. at gene 5' and 3'*), Tx- Tugev transkriptsioon (*Strong transcription*), EnhG - Geeni enhaanser (*Genic enhancers*).



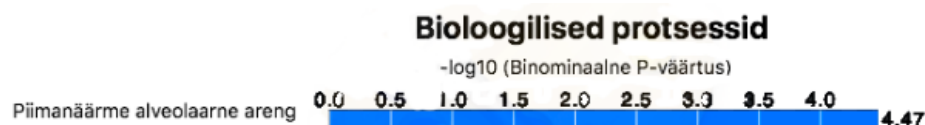
Joonis 10. IGV brauseriga visualiseeriti *TNF* geeni H3K27ac modifikatsiooni seondumiskohad. Sinise värviga on visualiseeritud psoriaasi patsiendid, SEL patsiendid punasega ja terved kontrollisikud mustaga. Uuritavate seondumiskohtade võrdluseks kasutati andmestikku *E124 Monocytes-CD14+ RO01746 Primary Cells*. Alumised värvid vastavad kromatiini regioonidele nagu näidatud joonisel 8 Enh – Enhaanserid (*Enhancers*); TssAFlnk - külgnev aktiivne transkriptsiooni alguskoht (*Flanking Active TSS*); TxFlnk - geeni 5' ja 3' otsad (*Transcr. at gene 5' and 3'*), TxWk- Nõrk transkriptsioon (*Weak transcription*), EnhG - Geeni enhaanser (*Genic enhancers*).

2.3.6 Erinevalt rikastatud regioonid

Diffbind¹⁵ programmi abiga oli eesmärk leida erinevalt rikastatud regioone (DE, *differentially enriched regions*) psoriaasi patsientide ja kontrollisikute vahel ning SEL patsientide ja kontrollisikute vahel. Võrreldes psoriaasi patsiente ja terveid kontrollisikuid programm ei leidnud ühtegi erinevalt rikastatud regiooni, kuid SEL patsientide ja kontrollide vahel leiti 1673 DE regiooni. 1162 nendest regioonidest olid positiivsed (*upregulated*) ehk SEL patsiendi rikastus on kõrgem võrreldes kontrollisikutega ning 511 regiooni olid negatiivsed (*downregulated*) ehk SEL patsiendi rikastus oli madalam. Annotatsiooniuuringuks rakendati GREAT andmebaasi⁸ ning uuriti DE regioonide seotust erinevate bioloogiliste protsessidega (joonis 11). SEL patsientide grupi positiivsed DE regioonid on seotud erinevate immuunprotsessidega, põletikulise vastusega ja kaasasündinud immuunvastusega. Negatiivsed DE regioonid olid seotud ainult ühe bioloogilise terminiga, see viitab sellele, et need 511 regiooni on väga erinevad.



Joonis 11. SEL patsientide positiivsete DE regioonide uurimine GREAT andmebaasis. 1162 regiooni olid positiivselt (*upregulated*) erinevalt rikastatud SEL patsientide ja kontrollisikute vahel.



Joonis 12. SEL patsientide negatiivsete DE regioonide uurimine GREAT andmebaasis. 511 regiooni olid negatiivselt (*downregulated*) erinevalt rikastatud SEL patsientide ja kontrollisikute vahel.

2.3.7 SEL patsientide positiivsete DE regioonide seondumismotiivid

Kasutades programmi MEME-ChIP otsiti transkriptsioonifaktorite seondumismotiive, mis kattuvad SEL patsientide positiivsete erinevalt rikastatud (DE) regioonidega. Motiivide leidmiseks võeti kogu regioonist FASTA järjestus ning sisestati MEME-ChIP andmebaasi. Motiiviotsinguga leiti seondumismotiivid (tabel 6). Tabelis on välja toodud motiivi järjestus, sarnasus erinevate transkriptsioonifaktorite seondumismotiividega ning E-väärtus. Leiti sarnaseid motiive *ELF3*, *FOS*, *JUNB* geenidega.

Tabel 6. SEL patsientide positiivsete DE regioonide kõige sagedasemad seondumismotiivid. Tabelis on välja toodud 2 motiivi. Samuti on lisatud sarnaste motiividega seonduvate transkriptsioonifaktorite nimetused ning E-väärtused, mis näitab, milline on tõenäosus, et avastatud tulem on saadud puht juhuse läbi.

Motiiv	Sarnased motiivid	E-väärtus
	ELF3	6,4e-0,12
	FOS JUNB	6,1e-003

Arutelu

Hiljutised uuringud on näidanud, et teatud vaktsineerimiste või infektsioonide korral võivad inimese kaasasündinud immuunrakud läbida ulatusliku metaboolse ja epigeneetilise ümberprogrammeerimise, mille tulemuseks on tugvam vastus järgmise nakatumise korral ka erineva haigustekitajaga. On oletatud, et põletikuliste haiguste korral aktiveeritakse treenitud immuunsust ülemäära ja see võimendab omakorda põletikku. Leentjens oma kolleegidega viisid läbi katseid treenitud immuunsusega ateroskleroosi puhul ning pakkusid välja, et kaasasündinud immuunrakkude treenimine on kasulik kaitseks korduvate infektsioonid eest, kuid aitab kaasa ateroskleroosi arengu progresseerumisele (Leentjens jt, 2018). Selle magistritöö eesmärgiks oli selgitada välja kas krooniline põletik mõjutab monotsüüte ning kutsub neis esile „treenitud“ seisundi.

Selgus, et psoriaasi patsientide ja kontrollisikute monotsüüdid ei erinenud üksteisest uuritud parameetrite poolest. Seevastu SEL patsientide monotsüüdid olid geeniekspressiooni poolest kontrollisikute monotsüütidest oluliselt erinevad. *TNFA* ekspressioon oli kõrgem SEL patsientide stimuleeritud monotsüütides, kuid *MMP8* ekpressiooni puhul oli tulemus vastupidine. $TNF\alpha$ on multifunktsionaalne põletikuline tsütokiin, mis on sünteesitud peamiselt monotsüütide ja makrofaagide poolt. See mõjutab lipiidide ainevahetust, insuliiniresistentsust, stimuleerib IL-1, IL-6 ja IL-8 produktsiooni, aktiveerib leukotsüüte ning on üks tähtsamaid tegureid rakusiseste parasiitide ja viiruste vastu (Chu, 2013). *MMP8* on aga põletiku negatiivne regulaator. (Dejonckheere jt, 2011). *MMP* perekonna proteiinid osalevad ekstratsellulaarse matriksi lagundamises normaalses füsioloogilistes protsessides, nagu embrüonaalne areng, paljunemine ja kudede ümberkujundamine, ning samuti haiguste protsessides, nagu artriit ja metastaasid (Ren jt, 2015).

Varasemad uuringud on näidanud, et treenitud loomuliku immuunsuse puhul toimub rikastus H3K4me3 ja H3K27ac modifikatsioonide osas mitmetes olulistes põletikuga seotud regioonides (Hoeksema ja Winther, 2016). Selleks, et uurida, kas krooniline põletik põhjustab monotsüütides epigeneetilisi muutusi kasutasime ChIP meetodit ja aktiivsele kromatiinile iseloomuliku histooni modifikatsiooni H3K27ac spetsiifilist antikeha. ChIP ja sekveneerimine viidi läbi 26 proovidele ning saadud seondumiskohtade arv (keskmine 39529; standardhälve = 9147,5) on võreldav publitseeritud töödega (Fu jt, 2018). Kasutades erinevaid arvutiprogramme, vaatasime kuidas jaotuvad uuritavad seondumiskohad kromatiini erinevatel aladel. Peaaegu pooled seondumiskohad asuvad enhaanseri alades mis on iseloomulik

H3K27ac modifikatsioonile. Tulemust kinnitas lugemite ja seandumiskohtade visualiseerimine referentsgenoomil, kus SEL ja psoriaasi patsientide, ning ka kontrollisikute proovidel leiti tugevad seandumiskohad *IL1B* geeni enhaanseri alas. Järgmiseks keskendusime diferentsiaalselt rikastunud alade analüüsile. Kooskõlas geeniekspressiooni andmetega ei leidunud psoriaasi patsientide monotsüütides uuritud modifikatsiooni osas erinevusi võrreldes kontrollisikute monotsüütidega, kuid SEL patsientide puhul leidsime erinevused nii geeniekspressioonis, kui ka kromatiinis. SEL puhul leidsime 1673 sellist regiooni, kus 1162 olid positiivselt rikastunud (rohkem avatud patsientide monotsüütides) ja 511 negatiivselt rikastunud. Uurides neid regioone leidsime, et positiivselt rikastunud regioonid on seotud immuunsüsteemi protsesside regulatsiooniga, tsütokiini vahendatud signaaliradadega ning põletikuliste vastustega. Negatiivsed regioonid, kus SEL patsiendi rikastus on madalam kui kontrollil, leiti ainult üks seotud bioloogiline protsess, mida on raske monotsüütidega seostada.

Kuna H3K27ac on omane enhaanser- ja promootoraladele, siis võib olulist informatsiooni leida ka transkriptsioonifaktorite seandumismotiivide otsingust, mis kattuvad SEL patsientide positiivselt erinevalt rikastatud regioonidega. Nendest tulemustest leidsime sarnaste motiividega geeninimetused nagu ELF3, FOS ja JUNB. *ELF3* geeni poolt kodeeritakse valk ESE-1. ESE-1 mängib olulist rolli COX-2 geeni reguleerimisel vastuseks endotoksiinile ja teistele põletikulistele stiimulitele. COX-2 ehk tsüklooksügenaas-2 on peamine ensüüm prostaglandiinide tootmisel, mis on olulised põletikumediaatorid. (Grall jt, 2005). DNA siduvate valkude Fos ja Jun perede liikmed moodustavad koos transkriptsioonile regulaatori AP-1 ehk aktivaatorvalk 1. AP-1 valkudel on tähtsus haiguste radadel, kaasa arvatud põletikuline vastus. Samuti Fos ja Jun valgud võivad toimida nii kasvaja promootoritena kui ka kasvaja supressoritena. (Zenz jt, 2008). Kuna need motiivid on seotud erinevate põletikuliste protsessidega võiks nende uurimine paremini selgitada haiguste patogeneesimehhanisme.

Treenitud immuunsuse spetsiifiliste mehhanismide tundmaõppimine ja suunamine võiks aidata välja töötada uudseid raviviise. Näiteks valgete vereliblede eellaste treenimine viib hematopoeetilise süsteemi püsiva positiivse vastuseni. See mõju võib aidata kiirendada uute valgeliblede teket, mis on eluliselt vajalikud kemoterapia ajal, mis omakorda võivad aeglustada vereloomet (Mitroulis jt, 2018). Krooniliste põletikuliste haiguste puhul, aga tuleks treenitud immuunsust hoopiski pidurdada.

KOKKUVÕTE

Treenitud loomulik immuunsus võimaldab makrofaagidel, monotsüütidel ja looduslikel tapjarakkudel (NK-rakud) tõsta vastupanuvõimet patogeenidele, aga ka võimendada patoloogilisi protsesse. Treenitud immuunsust suures osas juhivad epigeneetilised muutused nagu histoonide lüsiini jääkide metüleerimine ja atsetüleerimine.

Käesoleva magistritöö eesmärgiks oli uurida, kas treenitud immuunsuse mehhanismid võivad osaleda ka krooniliste põletikuliste haiguste patogeneesis. Tulemustest selgus, et psoriaasi patsientide monotsüüdid ei erinenud kontrollisikute monotsüütidest uuritud näitajate poolest. SEL puhul aga ekspresseerisid monotsüüdid infektsiooni mimikeerivate ligandidega stimuleerides oluliselt rohkem põletikumediaatorit *TNFA* ja vähem põletikku limiteerivat faktorit *MMP8*. Histoonimodifikatsiooni H3K27ac rikastumist kromatiini immunopretsipitatsiooni (ChIP) meetodil uurides leiti kontrollide ja SEL monotsüütide vahel 1673 erinevalt rikastunud regiooni. 1162 nendest regioonidest olid SEL patsiendide rakkudes kõrgemalt rikastunud ning seotud immuunvastuse reguleerimise ja põletikuliste protsessidega. Seega võib SEL puhul leida monotsüütidest treenitud loomulikule immuunsusele omaseid mutusi.

SUMMARY

Functional and epigenetic change in monocytes in chronic inflammatory diseases

Ekaterina Krassohhina

Classically immunological memory is performed by T and B lymphocytes of adaptive immunity. Innate immune cells lacking specificity for antigen, clonality and longevity, also have some capacity to remember. Trained innate immunity allows monocytes, macrophages and natural killer cells (NK-cells) to increase the resistance to pathogens. Trained immunity is driven by metabolic and epigenetic changes such as methylation and acetylation. In this study was studied the production of inflammatory mediators in psoriasis and SEL (Systemic lupus erythematosus) patients and health controls monocytes. Acetylation (H3K27ac) on inflammation-associated gene promoters and enhancers is one of the reasons for increased mediator production or trained immunity.

The aim of this Master's thesis was to stimulate monocytes from patients with chronic inflammatory diseases like psoriasis and SEL and control individual monocytes and evaluate the expression difference of the production of inflammatory mediators. Only *TNFA* and *MMP8* genes gave statistically significant differences between SEL patients and control subjects. *TNFA* gene expression was statistically significantly higher in SEL patients. In contrast to the result of the *TNFA* gene, the *MMP8* gene gave a statistically significant lower expression in SEL patients compared to healthy control group. In psoriasis patients monocyte the levels of inflammatory genes expression were not statistically significantly different from control subjects. For this disease the hypothesis was not approved. Another objective was to study the enrichment of the active chromatin characteristic H3K27ac histone modification by chromatin immunoprecipitation (ChIP) method. Binding sites found in ChIP-seq data analysis were mostly in enhancer areas, which is characteristic of the modification being studied. There were no differently enriched regions (DE) between the psoriasis and health controls, but 1673 DE was found for SEL patients. In 1162 of these regions the enrichment in the SEL patient derived monocytes was higher than in the control subjects' monocytes. The studied regions were associated with immune response regulation and inflammation. The results of this research help to better understand the differences in monocytes in chronic inflammatory diseases and could help study the pathological processes of these diseases in the future.

Tänuõnad

Käesolev magistritöö on valminud tänu kolleegide ja sõprade suurele abile ja toele. Suurimat tänu tahan avaldada minu juhatajatele Kai Kisandile ja Epp Kalevitele. Tänan võimaluse eest töötada koos teiega selles projektis. Aitäh, et tekkinul küsimusel leidsite kiiresti aega rääkimiseks, heaks õpetamiseks ning lõputöö kirjutamise abistamiseks. Tänuõnad molekulaarpatoloogia töögrupi liikmetele toetuste ja abi eest.

Moraalse toe eest tahan tänada enda perekonna, kes on olnud minu õpinguid igati toetavad. Suuremat tänu väärib õde, Maria Krassohhina. Lõpuks tahan tänada kursusekaaslast, kes oli alati nõus aidata ja abistada.

Kasutatud kirjanduse loetelu

- Ahsendorf, T., Müller, F. J., Topkar, V., Gunawardena, J., & Eils, R. (2017). Transcription factors, coregulators, and epigenetic marks are linearly correlated and highly redundant. *PloS one*, 12(12), e0186324. doi: 10.1371/journal.pone.0186324
- Alhamwe, B. A., Khalaila, R., Wolf, J., Bülow, V., Harb, H., Alhamdan, F., ... & Garn, H. (2018). Histone modifications and their role in epigenetics of atopy and allergic diseases. *Allergy, Asthma & Clinical Immunology*, 14(1), 39. doi: 10.1186/s13223-018-0259-4
- Anaya, J. M., Shoenfeld, Y., & Cervera, R. (2014). Systemic lupus erythematosus 2014. *Autoimmune diseases*, 2014. doi: 10.1155/2014/274323
- Arts, R. J., Novakovic, B., ter Horst, R., Carvalho, A., Bekkering, S., Lachmandas, E., ... & Habibi, E. (2016). Glutaminolysis and fumarate accumulation integrate immunometabolic and epigenetic programs in trained immunity. *Cell metabolism*, 24(6), 807-819. doi: 10.1016/j.cmet.2016.10.008
- Ayala-Fontáñez, N., Soler, D. C., & McCormick, T. S. (2016). Current knowledge on psoriasis and autoimmune diseases. *Psoriasis (Auckland, NZ)*, 6, 7. doi: 10.2147/PTT.S64950
- Barski, A., Cuddapah, S., Cui, K., Roh, T. Y., Schones, D. E., Wang, Z., ... & Zhao, K. (2007). High-resolution profiling of histone methylations in the human genome. *Cell*, 129(4), 823-837. doi: 10.1016/j.cell.2007.05.009
- Bannister, A. J., & Kouzarides, T. (2011). Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell research*, 21(3), 381. doi: 10.1038/cr.2011.22
- Baxter, D. (2014). Active and passive immunization for cancer. *Human vaccines & immunotherapeutics*, 10(7), 2123-2129. doi: 10.4161/hv.29604
- Bekkering, S., Blok, B. A., Joosten, L. A., Riksen, N. P., van Crevel, R., & Netea, M. G. (2016). In vitro experimental model of trained innate immunity in human primary monocytes. *Clin. Vaccine Immunol.*, 23(12), 926-933. doi: 10.1128/CVI.00349-16
- Bekkering, S., Joosten, L. A., van der Meer, J. W., Netea, M. G., & Riksen, N. P. (2013). Trained innate immunity and atherosclerosis. *Current opinion in lipidology*, 24(6), 487-492. doi: 10.1097/MOL.0000000000000002
- Blanke, R., Meakin, C., Millet, S., & Gardner, C. R. (1998). Selective Enhancement of LPS-induced serum TNF- α production by carrageenan pretreatment in Mice. *General Pharmacology: The Vascular System*, 31(2), 301-306. doi: 10.1016/S0306-3623(97)00434-5
- Bluestone, J.A., Bour-Jordan, H., Cheng, M., & Anderson, M. (2015). T cells in the control of organ-specific autoimmunity. *J Clin Invest*, 125(6):2250-2260. doi: 10.1172/JCI78089
- Bonilla, F. A., & Oettgen, H. C. (2010). Adaptive immunity. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 125(2), S33-S40. doi: 10.1016/j.jaci.2009.09.017

- Boyette, L. B., Macedo, C., Hadi, K., Elinoff, B. D., Walters, J. T., Ramaswami, B., ... & Metes, D. M. (2017). Phenotype, function, and differentiation potential of human monocyte subsets. *PLoS One*, 12(4), e0176460. doi: 10.1371/journal.pone.0176460
- Brandt, K. J., Fickentscher, C., Kruithof, E. K., & De Moerloose, P. (2013). TLR2 ligands induce NF- κ B activation from endosomal compartments of human monocytes. *PloS one*, 8(12), e80743. doi: 10.1371/journal.pone.0080743
- Calo, E., & Wysocka, J. (2013). Modification of enhancer chromatin: what, how, and why?. *Molecular cell*, 49(5), 825-837. doi: 10.1016/j.molcel.2013.01.038
- Cao, J., & Yan, Q. (2012). Histone ubiquitination and deubiquitination in transcription, DNA damage response, and cancer. *Frontiers in oncology*, 2, 26. doi: 10.3389/fonc.2012.00026
- Cheng, S. C., Quintin, J., Cramer, R. A., Shepardson, K. M., Saeed, S., Kumar, V., ... & Manjeri, G. R. (2014). mTOR-and HIF-1 α -mediated aerobic glycolysis as metabolic basis for trained immunity. *Science*, 345(6204), 1250684. doi: 10.1126/science.1250684
- Chiu, S., & Bharat, A. (2016). Role of monocytes and macrophages in regulating immune response following lung transplantation. *Current opinion in organ transplantation*, 21(3), 239. doi: 10.1097/MOT.0000000000000313
- Choi, J., Kim, S. T., & Craft, J. (2012). The pathogenesis of systemic lupus erythematosus—an update. *Current opinion in immunology*, 24(6), 651-657. doi: 10.1016/j.coi.2012.10.004
- Chu, W. M. (2013). Tumor necrosis factor. *Cancer letters*, 328(2), 222-225. doi: 10.1016/j.canlet.2012.10.014
- Craft, J. E. (2011). Dissecting the immune cell mayhem that drives lupus pathogenesis. *Science Translational Medicine*, 3(73), 73ps9-73ps9. doi: 10.1126/scitranslmed.3002138.
- Grammer, A. C., Dorner, T., & Lipsky, P. E. (2001). Abnormalities in B cell activity and the immunoglobulin repertoire in human systemic lupus erythematosus. *Mol Pathol Autoimmune Dis*, 2, 282-318.
- Creyghton, M. P., Cheng, A. W., Welstead, G. G., Kooistra, T., Carey, B. W., Steine, E. J., ... & Boyer, L. A. (2010). Histone H3K27ac separates active from poised enhancers and predicts developmental state. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(50), 21931-21936. doi: 10.1073/pnas.1016071107
- Cruz, C., Della Rosa, M., Krueger, C., Gao, Q., Horkai, D., King, M., ... & Houseley, J. (2018). Tri-methylation of histone H3 lysine 4 facilitates gene expression in ageing cells. *Elife*, 7, e34081. doi: 10.7554/eLife.34081.001
- Cui, X., Jing, X., Wu, X., Yan, M., Li, Q., Shen, Y., & Wang, Z. (2016). DNA methylation in spermatogenesis and male infertility. *Experimental and therapeutic medicine*, 12(4), 1973-1979. doi: 10.3892/etm.2016.3569
- Cvekl, A., & Duncan, M. K. (2007). Genetic and epigenetic mechanisms of gene regulation during lens development. *Progress in retinal and eye research*, 26(6), 555-597. doi: 10.1016/j.preteyeres.2007.07.002

- Dejonckheere, E., Vandenbroucke, R. E., & Libert, C. (2011). Matrix metalloproteinase8 has a central role in inflammatory disorders and cancer progression. *Cytokine & growth factor reviews*, 22(2), 73-81. doi: 10.1016/j.cytogfr.2011.02.002
- Doria, A., Zen, M., Bettio, S., Gatto, M., Bassi, N., Nalotto, L., ... & Punzi, L. (2012). Autoinflammation and autoimmunity: bridging the divide. *Autoimmunity reviews*, 12(1), 22-30. doi: 10.1016/j.autrev.2012.07.018
- Fessel, W. J. (1974). Systemic lupus erythematosus in the community: incidence, prevalence, outcome, and first symptoms; the high prevalence in black women. *Archives of Internal Medicine*, 134(6), 1027-1035. doi: 10.1001/archinte.1974.00320240061006
- Furue, K., Ito, T., Tsuji, G., Kadono, T., Nakahara, T., & Furue, M. (2018). Autoimmunity and autoimmune co-morbidities in psoriasis. *Immunology*, 154(1), 21-27. doi: 10.1111/imm.12891
- Gergianaki, I., & Bertsias, G. (2018). Systemic Lupus Erythematosus in Primary Care: an update and practical messages for the General Practitioner. *Frontiers in medicine*, 5, 161. doi: 10.3389/fmed.2018.00161
- Germic, N., Frangez, Z., Yousefi, S., & Simon, H. U. (2019). Regulation of the innate immune system by autophagy: Monocytes, macrophages, dendritic cells and antigen presentation. *Cell Death & Differentiation*, 1. doi: 10.1038/s41418-019-0297-6
- Gibcus, J. H., & Dekker, J. (2012). The context of gene expression regulation. *F1000 biology reports*, 4. doi: 10.3410/B4-8
- González, L. A., Toloza, S. M., & Alarcón, G. S. (2014). Impact of race and ethnicity in the course and outcome of systemic lupus erythematosus. *Rheumatic Disease Clinics*, 40(3), 433-454. doi: 10.1016/j.rdc.2014.04.001
- Goodrich, J. A., & Kugel, J. F. (2006). Non-coding-RNA regulators of RNA polymerase II transcription. *Nature reviews Molecular cell biology*, 7(8), 612. doi: 10.1038/nrm1946
- Grall, F. T., Prall, W. C., Wei, W., Gu, X., Cho, J. Y., Choy, B. K., ... & Goldring, M. B. (2005). The Ets transcription factor ESE-1 mediates induction of the COX-2 gene by LPS in monocytes. *The FEBS journal*, 272(7), 1676-1687. Doi: 10.1111/j.1742-4658.2005.04592.x
- Grant, C. R., Liberal, R., Mieli-Vergani, G., Vergani, D., & Longhi, M. S. (2015). Regulatory T-cells in autoimmune diseases: challenges, controversies and—yet—unanswered questions. *Autoimmunity reviews*, 14(2), 105-116. doi: 10.1016/j.autrev.2014.10.01
- Gudjonsson, J. E., Johnston, A., Sigmundsdottir, H., & Valdimarsson, H. (2004). Immunopathogenic mechanisms in psoriasis. *Clinical & Experimental Immunology*, 135(1), 1-8 doi: 10.1111/j.1365-2249.2004.02310.x
- Hahn, M. A., Wu, X., Li, A. X., Hahn, T., & Pfeifer, G. P. (2011). Relationship between gene body DNA methylation and intragenic H3K9me3 and H3K36me3 chromatin marks. *PloS one*, 6(4), e18844. doi: 10.1371/journal.pone.0018844

- Handy, D. E., Castro, R., & Loscalzo, J. (2011). Epigenetic modifications: basic mechanisms and role in cardiovascular disease. *Circulation*, 123(19), 2145-2156. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.110.956839
- Hato, T., & Dagher, P. C. (2015). How the innate immune system senses trouble and causes trouble. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, 10(8), 1459-1469. doi: 10.2215/CJN.04680514
- Haziot, A., Chen, S., Ferrero, E., Low, M. G., Silber, R., & Goyert, S. M. (1988). The monocyte differentiation antigen, CD14, is anchored to the cell membrane by a phosphatidylinositol linkage. *The Journal of Immunology*, 141(2), 547-552
- Henikoff, S., & Smith, M. M. (2015). Histone variants and epigenetics. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 7(1), a019364. doi: 10.1101/cshperspect.a019364
- Henneman, B., Van Emmerik, C., van Ingen, H., & Dame, R. T. (2018). Structure and function of archaeal histones. *PLoS genetics*, 14(9), e1007582. doi: 10.1371/journal.pgen.1007582
- Hoeksema, M. A., & de Winther, M. P. (2016). Epigenetic regulation of monocyte and macrophage function. *Antioxidants & redox signaling*, 25(14), 758-774. doi: doi.org/10.1089/ars.2016.6695
- Hornung, V., Rothenfusser, S., Britsch, S., Krug, A., Jahrsdörfer, B., Giese, T., ... & Hartmann, G. (2002). Quantitative expression of toll-like receptor 1–10 mRNA in cellular subsets of human peripheral blood mononuclear cells and sensitivity to CpG oligodeoxynucleotides. *The Journal of Immunology*, 168(9), 4531-4537. doi: 10.4049/jimmunol.168.9.4531
- Jakubzick, C. V., Randolph, G. J., & Henson, P. M. (2017). Monocyte differentiation and antigen-presenting functions. *Nature Reviews Immunology*, 17(6), 349. doi: 10.1038/nri.2017.28
- Johansen, K. M., & Johansen, J. (2006). Regulation of chromatin structure by histone H3S10 phosphorylation. *Chromosome Research*, 14(4), 393-404. doi: 10.1007/s10577-006-1063-4
- John, A. L. S., & Abraham, S. N. (2013). Innate immunity and its regulation by mast cells. *The Journal of Immunology*, 190(9), 4458-4463. doi: 10.4049/jimmunol.1203420
- Krueger, J. G., & Bowcock, A. (2005). Psoriasis pathophysiology: current concepts of pathogenesis. *Annals of the rheumatic diseases*, 64(suppl 2), ii30-ii36. doi: 10.1136/ard.2004.031120
- Kamen, D. L. (2014). Environmental influences on systemic lupus erythematosus expression. *Rheumatic Disease Clinics*, 40(3), 401-412. doi: 10.1016/j.rdc.2014.05.003
- Karmodiya, K., Krebs, A. R., Oulad-Abdelghani, M., Kimura, H., & Tora, L. (2012). H3K9 and H3K14 acetylation co-occur at many gene regulatory elements, while H3K14ac marks a subset of inactive inducible promoters in mouse embryonic stem cells. *BMC genomics*, 13(1), 424. doi: 10.1186/1471-2164-13-424
- Kawamura, S., Onai, N., Miya, F., Sato, T., Tsunoda, T., Kurabayashi, K., ... & Ohteki, T. (2017). Identification of a human clonogenic progenitor with strict monocyte differentiation

- potential: a counterpart of mouse cMoPs. *Immunity*, 46(5), 835-848. doi: 10.1016/j.immuni.2017.04.019
- Kawasaki, T., & Kawai, T. (2014). Toll-like receptor signaling pathways. *Frontiers in immunology*, 5, 461. doi: 10.3389/fimmu.2014.00461
- Kobayashi, S. D., & DeLeo, F. R. (2009). Role of neutrophils in innate immunity: a systems biology-level approach. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine*, 1(3), 309-333. doi: 10.1002/wsbm.32.
- Kusch, T. (2012). Histone H3 lysine 4 methylation revisited. *Transcription*, 3(6), 310-314. doi: 10.4161/trns.21911
- Latchman, D. S. (1997). Transcription factors: an overview. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 29(12), 1305-1312. doi: 10.1016/S1357-2725(97)00085-X
- Latz, E., Visintin, A., Lien, E., Fitzgerald, K. A., Espevik, T., & Golenbock, D. T. (2003). The LPS receptor generates inflammatory signals from the cell surface. *Journal of endotoxin research*, 9(6), 375-380. doi: 10.1177/09680519030090061101
- Leentjens, J., Bekkering, S., Joosten, L. A., Netea, M. G., Burgner, D. P., & Riksen, N. P. (2018). Trained innate immunity as a novel mechanism linking infection and the development of atherosclerosis. *Circulation research*, 122(5), 664-669. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.117.312465
- Lipsky, P. E. (2001). Systemic lupus erythematosus: an autoimmune disease of B cell hyperactivity. *Nature immunology*, 2(9), 764. doi: 10.1038/ni0901-764
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻ΔΔCT method. *methods*, 25(4), 402-408. doi: 10.1006/meth.2001.1262
- Mariño-Ramírez, L., Kann, M. G., Shoemaker, B. A., & Landsman, D. (2005). Histone structure and nucleosome stability. *Expert review of proteomics*, 2(5), 719-729. doi: 10.1586/14789450.2.5.719
- McGinty, R. K., & Tan, S. (2014). Nucleosome structure and function. *Chemical reviews*, 115(6), 2255-2273. doi: 10.1021/cr500373h
- Meglio, P.D., Villanova, F., & Nestle, F.O. (2014). Psoriasis. *Cold Spring Harb Perspect Med*. doi: 10.1101/cshperspect.a015354
- Mercurio, C., Plyte, S., & Minucci, S. (2012). Alterations of histone modifications in cancer. In *Epigenetics in Human Disease* (pp. 53-87). Elsevier Inc.. doi: 10.1016/B978-0-12-388415-2.00004-4
- Mi, W., Guan, H., Lyu, J., Zhao, D., Xi, Y., Jiang, S., ... & Tora, L. (2017). YEATS2 links histone acetylation to tumorigenesis of non-small cell lung cancer. *Nature communications*, 8(1), 1088. doi: 10.1038/s41467-017-01173-4
- Mitroulis, I., Ruppova, K., Wang, B., Chen, L. S., Grzybek, M., Grinenko, T., ... & Chatzigeorgiou, A. (2018). Modulation of myelopoiesis progenitors is an integral component

of trained immunity. *Cell*, 172(1-2), 147-161. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2017.11.034>

Moore, L. D., Le, T., & Fan, G. (2013). DNA methylation and its basic function. *Neuropsychopharmacology*, 38(1), 23. doi: 10.1038/npp.2012.112

Moulton, V. R., Suarez-Fueyo, A., Meidan, E., Li, H., Mizui, M., & Tsokos, G. C. (2017). Pathogenesis of human systemic lupus erythematosus: a cellular perspective. *Trends in molecular medicine*, 23(7), 615-635. doi: 10.1016/j.molmed.2017.05.006

Netea, M. G., Quintin, J., & van der Meer, J. W. (2011). Trained immunity: a memory for innate host defense. *Cell host & microbe*, 9(5), 355-361. doi: 10.1016/j.chom.2011.04.006

Netea, M. G., Joosten, L. A., Latz, E., Mills, K. H., Natoli, G., Stunnenberg, H. G., ... & Xavier, R. J. (2016). Trained immunity: a program of innate immune memory in health and disease. *Science*, 352(6284), aaf1098. doi: 10.1126/science.aaf1098

Ni, C., & Chiu, M. W. (2014). Psoriasis and comorbidities: links and risks. *Clinical, cosmetic and investigational dermatology*, 7, 119. doi: 10.2147/CCID.S44843

Nikolov, D. B., & Burley, S. K. (1997). RNA polymerase II transcription initiation: a structural view. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(1), 15-22. doi: 10.1073/pnas.94.1.15

Ostuni, R., Piccolo, V., Barozzi, I., Polletti, S., Termanini, A., Bonifacio, S., ... & Natoli, G. (2013). Latent enhancers activated by stimulation in differentiated cells. *Cell*, 152(1-2), 157-171. doi: 10.1016/j.cell.2012.12.018.

Padovan, E., & Martin, S. F. (2016). innate immune Cell determinants of t Cell immunity: From Basic Mechanisms to Clinical implications. *Frontiers in immunology*, 6, 664. doi: 10.3389/fimmu.2015.00664

Pandey, R., MuÈller, A., Napoli, C. A., Selinger, D. A., Pikaard, C. S., Richards, E. J., ... & Jorgensen, R. A. (2002). Analysis of histone acetyltransferase and histone deacetylase families of *Arabidopsis thaliana* suggests functional diversification of chromatin modification among multicellular eukaryotes. *Nucleic acids research*, 30(23), 5036-5055. doi: 10.1093/nar/gkf660

Pillai, S. (2013). Rethinking mechanisms of autoimmune pathogenesis. *Journal of autoimmunity*, 45, 97-103. doi: 10.1016/j.jaut.2013.05.003

Price, J. D., & Tarbell, K. V. (2015). The role of dendritic cell subsets and innate immunity in the pathogenesis of type 1 diabetes and other autoimmune diseases. *Frontiers in immunology*, 6, 288. doi: 10.3389/fimmu.2015.00288

Quintin, J., Saeed, S., Martens, J. H., Giamarellos-Bourboulis, E. J., Ifrim, D. C., Logie, C., ... & Joosten, L. A. (2012). *Candida albicans* infection affords protection against reinfection via functional reprogramming of monocytes. *Cell host & microbe*, 12(2), 223-232. doi: 10.1016/j.chom.2012.06.006

- Ransom, M., Dennehey, B. K., & Tyler, J. K. (2010). Chaperoning histones during DNA replication and repair. *Cell*, 140(2), 183-195. doi: 10.1016/j.cell.2010.01.004
- Ren, F., Tang, R., Zhang, X., Madushi, W. M., Luo, D., Dang, Y., ... & Chen, G. (2015). Overexpression of MMP family members functions as prognostic biomarker for breast cancer patients: a systematic review and meta-analysis. *PloS one*, 10(8), e0135544. doi: 10.1371/journal.pone.0135544
- Roeder, R. G. (1996). The role of general initiation factors in transcription by RNA polymerase II. *Trends in biochemical sciences*, 21(9), 327-335. doi: 10.1016/S0968-0004(96)10050-5
- Rosenblum, M. D., Remedios, K. A., & Abbas, A. K. (2015). Mechanisms of human autoimmunity. *The Journal of clinical investigation*, 125(6), 2228-2233. doi: 10.1172/JCI78088
- Rossetto, D., Avvakumov, N., & Côté, J. (2012). Histone phosphorylation: a chromatin modification involved in diverse nuclear events. *Epigenetics*, 7(10), 1098-1108. doi: 10.4161/epi.21975
- Rougeulle, C., Chaumeil, J., Sarma, K., Allis, C. D., Reinberg, D., Avner, P., & Heard, E. (2004). Differential histone H3 Lys-9 and Lys-27 methylation profiles on the X chromosome. *Molecular and cellular biology*, 24(12), 5475-5484. doi: 10.1128/MCB.24.12.5475-5484.2004
- Rusek, P., Wala, M., Druszczyńska, M., & Fol, M. (2018). Infectious agents as stimuli of trained innate immunity. *International journal of molecular sciences*, 19(2), 456. doi: 10.3390/ijms19020456
- Saeed, S., Quintin, J., Kerstens, H. H., Rao, N. A., Aghajani-refah, A., Matarese, F., ... & Sharifi, N. (2014). Epigenetic programming of monocyte-to-macrophage differentiation and trained innate immunity. *Science*, 345(6204), 1251086. doi: 10.1126/science.1251086
- Sarac, G., Koca, T. T., & Baglan, T. (2016). A brief summary of clinical types of psoriasis. *Northern clinics of Istanbul*, 3(1), 79. doi: 10.14744/nci.2016.16023
- Shamri, R., Xenakis, J. J., & Spencer, L. A. (2011). Eosinophils in innate immunity: an evolving story. *Cell and tissue research*, 343(1), 57-83. doi: 10.1007/s00441-010-1049-6
- Shen, S., & Casaccia-Bonnel, P. (2008). Post-translational modifications of nucleosomal histones in oligodendrocyte lineage cells in development and disease. *Journal of Molecular Neuroscience*, 35(1), 13-22. doi: 10.1007/s12031-007-9014-x
- Smith, D. A., & Germolec, D. R. (1999). Introduction to immunology and autoimmunity. *Environmental health perspectives*, 107(suppl 5), 661-665. doi: 10.1289/ehp.99107s5661
- Spiering, M. J. (2015). Primer on the immune system. *Alcohol research: current reviews*, 37(2), 171. PMID: 26695756

- Strahl, B. D., Ohba, R., Cook, R. G., & Allis, C. D. (1999). Methylation of histone H3 at lysine 4 is highly conserved and correlates with transcriptionally active nuclei in *Tetrahymena*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(26), 14967-14972. doi: 10.1073/pnas.96.26.14967
- Struhl, K., & Segal, E. (2013). Determinants of nucleosome positioning. *Nature structural & molecular biology*, 20(3), 267. doi: doi.org/10.1038/nsmb.2506
- Topham, N. J., & Hewitt, E. W. (2009). Natural killer cell cytotoxicity: how do they pull the trigger?. *Immunology*, 128(1), 7-15. doi: 10.1111/j.1365-2567.2009.03123.x
- Touitou, I., & Koné-Paut, I. (2008). Autoinflammatory diseases. *Best practice & research Clinical rheumatology*, 22(5), 811-829. doi: 10.1016/j.berh.2008.08.009.
- Venters, B. J., & Pugh, B. F. (2009). How eukaryotic genes are transcribed. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*, 44(2-3), 117-141. doi: 10.1080/10409230902858785
- Wang, L., Wang, F. S., & Gershwin, M. E. (2015). Human autoimmune diseases: a comprehensive update. *Journal of internal medicine*, 278(4), 369-395. doi: 10.1111/joim.12395
- Wei, J. W., Huang, K., Yang, C., & Kang, C. S. (2017). Non-coding RNAs as regulators in epigenetics. *Oncology reports*, 37(1), 3-9. doi: 10.3892/or.2016.5236.
- Wiles, E. T., & Selker, E. U. (2017). H3K27 methylation: a promiscuous repressive chromatin mark. *Current opinion in genetics & development*, 43, 31-37. doi: 10.1016/j.gde.2016.11.001
- Willis, C., Morris, J. M., Danis, V., & Gallery, E. D. M. (2003). Cytokine production by peripheral blood monocytes during the normal human ovulatory menstrual cycle. *Human Reproduction*, 18(6), 1173-1178. doi: 10.1093/humrep/deg231
- Wilson, A. G. (2008). Epigenetic regulation of gene expression in the inflammatory response and relevance to common diseases. *Journal of periodontology*, 79, 1514-1519. doi: 10.1902/jop.2008.080172.
- Yan, C., & Boyd, D. D. (2006). Histone H3 acetylation and H3 K4 methylation define distinct chromatin regions permissive for transgene expression. *Molecular and cellular biology*, 26(17), 6357-6371. doi: 10.1128/MCB.00311-06
- Zenz, R., Eferl, R., Scheinecker, C., Redlich, K., Smolen, J., Schonhaler, H. B., ... & Wagner, E. F. (2008). Activator protein 1 (Fos/Jun) functions in inflammatory bone and skin disease. *Arthritis research & therapy*, 10(1), 201. doi: 10.1186/ar2338
- Zhang, M., & Wang, J. (2015). Epigenetic regulation of gene expression in osteoarthritis. *Genes & diseases*, 2(1), 69-75. doi: 10.1016/j.gendis.2014.12.005
- Zhou, W., Zhu, P., Wang, J., Pascual, G., Ohgi, K. A., Lozach, J., ... & Rosenfeld, M. G. (2008). Histone H2A monoubiquitination represses transcription by inhibiting RNA polymerase II transcriptional elongation. *Molecular cell*, 29(1), 69-80. doi: 10.1016/j.molcel.2007.11.002

Ziegler-Heitbrock, H. W. L., & Ulevitch, R. J. (1993). CD14: cell surface receptor and differentiation marker. *Immunology today*, 14(3), 121-125. doi: 10.1016/0167-5699(93)90212-4

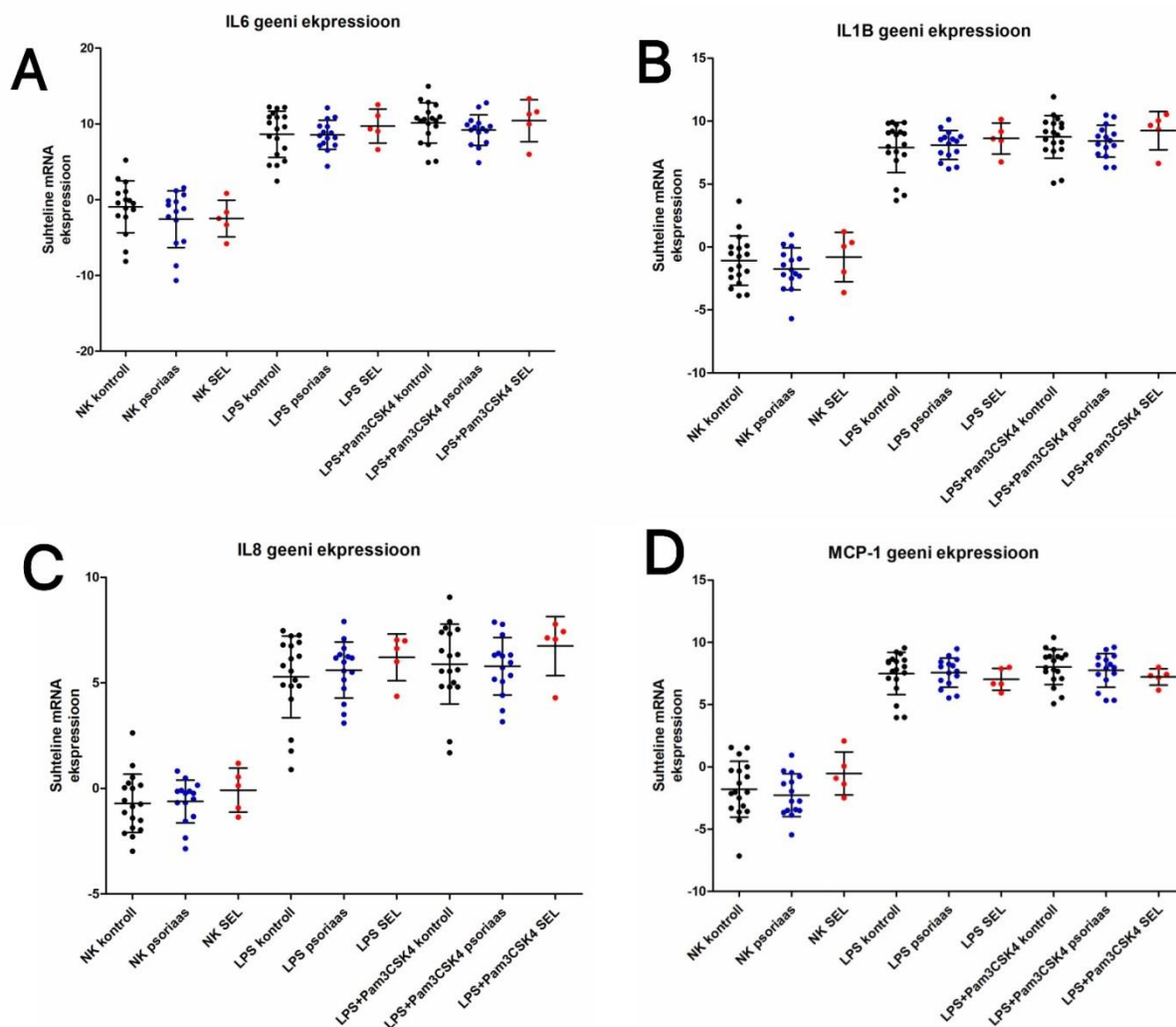
Ziegler-Heitbrock, L. (2007). The CD14⁺ CD16⁺ blood monocytes: their role in infection and inflammation. *Journal of leukocyte biology*, 81(3), 584-592. doi: 10.1189/jlb.0806510

Kasutatud veebiaadress

- ¹ <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>
- ² http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/trim_galore/
- ³ <http://www.nature.com/nmeth/journal/v9/n4/full/nmeth.1923.html>
- ⁴ <http://www.htslib.org/>
- ⁵ <http://broadinstitute.github.io/picard>
- ⁶ <https://github.com/taoliu/MACS/>
- ⁷ <http://hgdownload.cse.ucsc.edu/goldenPath/hg19/encodeDCC/wgEncodeMapability/wgEncodeDacMapabilityConsensusExcludable.bed.gz>
- ⁸ <http://great.stanford.edu/public/html/>
- ⁹ <http://meme-suite.org/tools/meme-chip>
- ¹⁰ https://egg2.wustl.edu/roadmap/web_portal/chr_state_learning.html
- ¹¹ <https://bioconductor.org/packages/release/bioc/html/DiffBind.html>
- ¹² <http://www.nature.com/nbt/journal/v29/n1/abs/nbt.1754.html>
- ¹³ <https://graphpad-prism.software.informer.com/5.0/>

LISAD

Lisa 1. Psoriaasi ja SEL patsientide ning tervete isikute monotsüütide stimuleerimine LPS ja LPS+Pam3CSK4 24 tundi. Vastavalt ootustele toimus põletikumediaatorite ekspressiooni tõus stimuleeritud proovides võrreldes negatiivse kontrollprooviga. X-teljel on välja toodud NK ehk negatiivsed kontrollproovid, ning proovid stimuleeritud kas LPS või LPS+Pam3CSK4 24 tundi. Y-teljel on suhteline mRNA ekspressioon.



Lisa 2. Proovide fragmentide ja piikide arv pärast filtreerimist.

	Proovi nimi	Toorandmed	Filtreeritud fragmentid	Filtreeritud piigid
1	Psoriaas 1	21933252	18330184	48729

2	Psoriaas 2	31270423	27315959	45171
3	Psoriaas 3	18941304	12803919	39020
4	Psoriaas 4	21336356	18423145	42798
5	Psoriaas 5	15143702	7115556	25655
6	Psoriaas 6	21439612	18797800	39111
7	Psoriaas 7	29832573	25931757	45883
8	Psoriaas 8	26408446	23428076	41611
9	Psoriaas 9	27030206	23815697	40060
10	Psoriaas 10	18024625	14708691	19318
11	Psoriaas 11	17633851	14626543	29527
1	Luupus 1	9051531	7809756	28148
2	Luupus 2	21215769	18566910	41944
3	Luupus 3	16384518	13341713	36251
4	Luupus 4	28403540	24739735	50328
1	Kontroll 1	26262026	22563928	47004
2	Kontroll 2	28148376	24552665	49327
3	Kontroll 3	27569901	24276566	43045
4	Kontroll 4	18348462	9950548	31315
5	Kontroll 5	25136366	20039599	23671
6	Kontroll 6	31150166	21754022	44553
7	Kontroll 7	26567464	20851548	33005
8	Kontroll 8	18424232	16462999	37208
9	Kontroll 9	26964820	22318501	41088
10	Kontroll 10	54287507	48154289	58559
11	Kontroll 11	25991448	17247824	45416

Lisa 3. Psoriaasi patsientide ja tervete kontrollide seondumiskohtade jaotuvus genoomis.



Psoriaase patsientide (a) ja tervete kontrollisikute (b) piikide jaotuvus genoomis. H3K27ac seondumiskohtade leidmiseks genoomil kasutati programmi MACS2. Seondumiskohtade jaotuvuse uurimiseks võrdlesime proove ChromHMM¹³ andmebaasist monotsüütide andmestikuga *E124 Monocytes-CD14+ RO01746 Primary Cells*. Joonisel on protsentidega näidatud seondumiskohtade kattuvus erinevate regioonidega. *Active TSS* – aktiivse transkriptsiooni alguskoht; *Flanking Active TSS* – külgnev aktiivne transkriptsiooni alguskoht; *Transcr. at gene 5' and 3'* – geeni 5' ja 3' otsad; *Strong transcription* – tugev transkriptsioon; *Weak transcription* – nõrk transkriptsioon; *Genic enhancers* – geeni enhaanser; *Enhancers* – enhaanser; *ZNF genes & repeats* – ZNF geenid ja kordusjärjestused; *Heterochromatin* – heterokromatiin; *Bivalent/poised TSS* – bivalente transkriptsiooni alguskoht; *Flanking Bivalent TSS/Enh* – külgnev bivalentne transkriptsiooni alguskoht/enhaanser; *Bivalent Enhancer* – bivalentne enhaanser; *Repressed PolyComb* – represseeritud PolyComb; *Weak Repressed PolyComb* – nõrgalt represseeritud PolyComb; *Quiescent /Low* – madala aktiivsusega ala.

Lihtlitsents

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Ekaterina Krassohhina

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) minu loodud teose

Funktsionaalsed ja epigeneetilised muutused monotsüütides krooniliste põletikuliste haiguste korral,

mille juhendaja on Kai Kisand, PhD ja Epp Kaleviste, MSc,

reprodutseerimiseks eesmärgiga seda säilitada, sealhulgas lisada digitaalarhiivi DSpace kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.

2. Annan Tartu Ülikoolile loa teha punktis 1 nimetatud teos üldsusele kättesaadavaks Tartu Ülikooli veebikeskkonna, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace kaudu Creative Commons'i litsentsiga CC BY NC ND 3.0, mis lubab autorile viidates teost reprodutseerida, levitada ja üldsusele suunata ning keelab luua tuletatud teost ja kasutada teost ärieesmärgil, kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.
3. Olen teadlik, et punktides 1 ja 2 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
4. Kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei riku ma teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse õigusaktidest tulenevaid õigusi.

Ekaterina Krassohhina
30.05.2019